

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE'DE ŞEKER PANCARI ÜRETİM ALANLARINDA ENFEKSİYON
OLUŞTURAN *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) İZOLATLARININ P31
PROTEİNİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

MURAT GÜNGÖR

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

SAMSUN

2020

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Murat GÜNGÖR tarafından hazırlanan "Türkiye’de şeker pancarı üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan *Beet Necrotic Yellow Vein Virus* (BNYVV) izolatlarının P31 proteininin moleküler karakterizasyonu" adlı tez çalışması .../.../2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri

Başkan Prof. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Miray SÖKMEN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Özer ÇALIŞ
Akdeniz Üniversitesi
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım. .../.../2020

İmza

Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

.../.../2020

Murat GÜNGÖR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE'DE ŞEKER PANCARI ÜRETİM ALANLARINDA ENFEKSİYON OLUŞTURAN *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) İZOLATLARININ P31 PROTEİNİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Murat GÜNGÖR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ

Vektör *Polymyxa betae* ile taşınan ve "rhizomania" hastalığına neden olan *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), şeker pancarı üretim alanlarında sıklıkla rastlanan en tahripkar virüstür. Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden elde edilmiş olan ve BNYVV ile bulaşık olduğu bilinen 15 toprak örneği kullanılmıştır. Öncelikle, tuzak bitki testi yöntemine göre BNYVV izolatlarının yeniden çoğaltımı sağlanmıştır. Şeker pancarı köklerinde *P. betae*'nin varlığı mikroskopik olarak ve RT-PCR ile belirlenmiştir.

BNYVV RNA-4'ü tarafından kodlanan P31 proteini, virüsün vektörle etkili taşınması ve virülensi ile ilişkilidir. Bu çalışmada, 10 BNYVV izolatının P31 gen bölgesinin nükleotit dizileri elde edilmiştir. Bu izolatların Dünya izolatları ile BLAST analizi ve elde edilen filogenetik ağaç, izolatları; Grup II ve Grup III olmak üzere iki farklı P31 grubuna ayırmıştır. Grup II'de sadece IGDR-6 izolatı yer almış, Kas2 izolatı (Kazakistan) ile yüksek nükleotit benzerliğine (%99.76) sahip olduğu belirlenmiştir. GZNP-27, ELZG-44, SMSN-61, EDRN-125, BRSA-148, CNKL-150, KSTM-281, KYSR-524 ve ANKR-617 izolatları ise Grup III'de yer almış, IV4 izolatı (İtalya) ile en yüksek benzerlik (%99.88-%100) göstermişlerdir.

Ayrıca, 15 BNYVV izolatı virüsün sistemik konukçusu *Nicotiana benthamiana*'ya mekanik olarak inokule edilmiştir. Şiddetli (cücelik ve mozayik) ya da zayıf (mozayik) semptom oluşumu gözlenen bu bitkilerin sistemik yapraklarından RNA izolasyonunu takiben, gen spesifik primerler kullanılarak RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda; 15 BNYVV izolatı ile enfekteli *N. Benthamiana*'da P31 geni ile ilgili bölge saptanmasına rağmen, kılıf proteini bölgesi 10 izolatta, P25 gen bölgesi 1 izolatta, P26 gen bölgesi ise 4 izolatta belirlenmiştir. Bu sonuç, *N. benthamiana*'da BNYVV'nin semptom oluşumunda P31 geninin rol oynadığını desteklemiş, P25 ve P26 gen bölgelerinin ise bazı izolatlarda virüsün replikasyonu esnasında tespit edilemediğini göstermiştir.

Ocak 2020, 135 sayfa

Anahtar Kelimeler: Rhizomania, *P. betae*, P31, *N. benthamiana*

ABSTRACT

Master's Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF P31 PROTEIN OF *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) ISOLATES IN SUGAR BEET PRODUCTION AREAS OF TURKEY

Murat GÜNGÖR

Ondokuz Mayıs University
Graduate School of Natural and Applied Science's
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), which is known as "the agent of rhizomania disease" and transmitted by *Polymyxa betae*, is the most destructive and prevalent virus in sugar beet fields. In this study, 15 BNYVV-infested soil samples were selected according to their geographic locations. Firstly, BNYVV was propagated as bait plant technique. The presence of *P. betae* was detected in the roots of bait plants using a light microscopy and by RT-PCR using specific primers.

P31 protein encoded by BNYVV RNA-4 is associated with efficient vector transmission and virulence. In this study, nucleotide sequences of P31 coding region of 10 different isolates were obtained. The BLAST and phylogenetic analysis divided BNYVV isolates into two different P31 groups as Group II and Group III. The Group II consisted of only IGDR-6 isolate and found to have high nucleotide identity with Kas2 isolate (99.76%). Also, GZNP-27, ELZG-44, SMSN-61, EDRN-125, BRSA-148, CNKL-150, KSTM-281, KYSR-524 and ANKR-617 which were divided into Group III had the highest similarity (99.88%-100%) with IV4 isolate (Italy).

Additionally, systemic host *Nicotiana benthamiana* was mechanically inoculated by 15 BNYVV isolates. Some BNYVV isolates induced very strong symptom (dwarfing and mosaic) the others induced mild symptom (mosaic) on *N. benthamiana*. After RNA isolation, RT-PCR studies were conducted by using gene specific primers. This study showed that the P31 gene could be detected in *N. benthamiana* plants infected with 15 BNYVV isolates, the CP gene with only 10 isolates, the P25 gene with one isolate and the P26 gene with four isolates. This result supported that the P31 gene is involved in symptom expression on *N. benthamiana*, the P25 and P26 genes were not possible to be detected with some BNYVV isolates during virus replication.

January 2020, 135 pages

Keywords: Rhizomania, *P. betae*, P31, *N. benthamiana*

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmalarım boyunca değerli fikirleri ile bana her zaman yol gösteren; ilgi, bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında bilgisini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Miray SÖKMEN'e, laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Doktora Öğrencisi Yük. Zir. Müh. Ebru ERKAN'a ve Yük. Zir. Müh. Hüseyin UZUNBACAK'a ve emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Ocak 2020, Samsun

Murat GÜNGÖR

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Virüsün Morfolojisi, Taksonomisi ve Genomik Özellikleri.....	5
2.2. Streyn Tipleri.....	9
2.3. Coğrafik Dağılımı.....	11
2.4. Simptomatoloji ve Konukçu Çevresi.....	12
2.5. Zararı ve Ekonomik Önemi.....	14
2.6. Vektör <i>Polymyxa betae</i>	15
2.7. Hastalığın Kontrolü.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Toprak örnekleri.....	19
3.1.2. Şeker Pancarı Tohumları.....	20
3.1.3. Test Bitkileri.....	20
3.1.4. Antiserum.....	21
3.1.5. Mikropleytlar.....	21
3.1.6. Primerler.....	21
3.1.7. Tampon Çözeltiler.....	22
3.2. YÖNTEM.....	22
3.2.1. Tuzak Bitki Testi Yöntemi.....	22
3.2.2. ELISA Testi.....	23
3.2.3. Tuzak Bitki Köklerinde Vektör <i>Polymyxa betae</i> 'nin Kök Boyaması Yöntemi ile Araştırılması.....	24

3.2.4. Moleküler Çalışmalar	24
3.2.4.1. RNA İzolasyonu	24
3.2.4.2. Tuzak Bitki Köklerinde Vektör <i>Polymyxa betae</i> 'nin RT-PCR Yöntemi ile Araştırılması	25
3.2.4.3. BNYVV İzolatlarının P31 Geninin Çoğaltılması	25
3.2.4.4. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi	26
3.2.4.5. BNYVV İzolatlarının P31 Protein Bölgelerinin Nükleotit Dizilerinin Elde Edilmesi	26
3.2.4.6. BNYVV İzolatlarının P31 Genine Göre Moleküler Karakterizasyonu	27
3.2.5. Biyolojik Çalışmalar	27
3.2.5.1. <i>N. benthamiana</i> Bitkilerinde Yürütülen Moleküler Çalışmalar	29
3.2.5.1.1. Kılıf Protein Bölgesinin RT-PCR Yöntemi ile Çoğaltılması	30
3.2.5.1.2. P25 Protein Bölgesinin RT-PCR Yöntemi ile Çoğaltılması	31
3.2.5.1.3. P26 Protein Bölgesinin RT-PCR Yöntemi ile Çoğaltılması	32
3.2.5.1.4. P31 Protein Bölgesinin RT-PCR Yöntemi ile Çoğaltılması	32
3.2.5.1.5. <i>N. benthamiana</i> Bitkilerinden Elde Edilen BNYVV İzolatlarının P31 Genine Ait Bölgenin Nükleotit Dizilerinin Elde Edilmesi	32
3.2.5.2. <i>N. benthamiana</i> 'dan elde edilen BNYVV İzolatlarının <i>N. benthamiana</i> Bitkilerine İkinci Aktarımı	33
4. BULGULAR	34
4.1. Tuzak Bitki Testi ve ELISA Testi Sonuçları	34
4.2. Kök Boyaması Yöntemine Göre Tuzak Bitki Köklerinde Vektör <i>Polymyxa betae</i> 'nin Belirlenmesi	35
4.3. RT-PCR Yöntemi ile Tuzak Bitki Köklerinde Vektör <i>Polymyxa betae</i> 'nin Belirlenmesi	36
4.4. BNYVV İzolatlarında P31 Genini İçeren Bölgenin Çoğaltılması	37
4.5. BNYVV İzolatlarının P31 Proteininin Baz ve Amino Asit Dizisi Analiz Sonuçları	39
4.6. BNYVV İzolatlarının P31 Genine Göre Filogenetik Analizi	46
4.7. BNYVV'nin Sistemik Konukçuları ile Yürütülen Biyolojik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular	48
4.7.1. BNYVV İzolatları ile İnokule Edilen <i>N. benthamiana</i> Bitkilerinde Yürütülen Biyolojik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular	49
4.7.2. BNYVV İzolatları ile İnokule Edilen <i>N. benthamiana</i> Bitkilerinde Yürütülen Moleküler Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular	66
4.7.3. BNYVV İzolatları ile İnokule Edilen <i>Nicotiana benthamiana</i> Bitkilerinde P31 Proteininin Baz ve Amino Asit Dizisi Analiz Sonuçları	72

4.7.4. <i>N. benthamiana</i> 'dan elde edilen BNYVV İzolatlarının <i>N. benthamiana</i> Bitkilerine İkinci Aktarımı Sonucu Elde Edilen Bulgular	77
4.7.4.1. <i>N. benthamiana</i> 'dan elde edilen BNYVV İzolatlarının <i>N. benthamiana</i> Bitkilerine İkinci Aktarımı Sonucu Moleküler Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular.....	87
4.7.5. BNYVV İzlatları ile İnokule Edilen <i>Spinacia oleraceae</i> ve <i>Beta vulgaris</i> Bitkileri ile Yürütülen Biyolojik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular	88
5. TARTIŞMA	91
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	100
KAYNAKLAR	102
EKLER	113
ÖZ GEÇMİŞ	



SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
bp	Baz çifti
da	Dekar
dk	Dakika
g	Gram
ha	Hektar
kb	Kilobaz
kda	Kilodalton
kg	Kilogram
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimol
nm	Nanometre
pH	Acidity/Basicity of aqueous solution
rpm	Revolutions per minute
s	Saniye

KISALTMALAR

A	Alanin
aa	Amino asit
BNYVV	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
BSBMV	<i>Beet soilborne mosaic virus</i>
BSBV	<i>Beet soilborne virus</i>
BVQ	<i>Beet virus Q</i>
C	Sistein
<i>C. quinoa</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>
CP	Coat protein (Kılıf proteini)
DAS-ELISA	Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FAO	Food and Agriculture Organization
G	Glisin
H	Histidin
K	Kloroz
KLL	Klorotik lokal leke
L	Lokal enfeksiyon
ML	Maxium Likelihood
MTR	Metil transferaz
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLL	Nekrotik lokal leke
nt	Nükleotit
ORF	Open reading frame
<i>P. betae</i>	<i>Polymyxa betae</i>
PBS	Fosfat Tamponu Salin
PTGS	Post transcriptional gene silencing
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
<i>S. oleracea</i>	<i>Spinacia oleracea</i>

T	Timin
<i>T. expansa</i>	<i>Tetragonia expansa</i>
TGB	Triple gene block (üçlü gen bloğu)
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
USDA-ARS	National Center for Genetic Resources Preservation
YD	Yaprak deformasyonu
ZM	Zayıf mozayik
M	Mozayik
C	Cüceleşme



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. BNYVV partiküllerinin elektron mikroskoptaki görünümü (M. Erhardt, IBMP).....	6
Şekil 2.2. BNYVV'nin genomik bileşenleri (McGrann vd, 2009)	7
Şekil 2.3. Hastalığın tarlada görünümü ve renk adacıklarının oluşumu (Poimenopoulou, 2017).....	13
Şekil 2.4. Rhizomania'lı şeker pancarı köklerindeki sakal görünümü (A) ile yaprakta oluşan nekrotik sarı damar simptomsu (B) (Anonim, 2019)	13
Şekil 2.5. <i>Polymyxa betae</i> 'nin yaşam döngüsü (Keskin, 1964)	17
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan toprak örneklerinin temin edildiği iller. Kırmızı renkli ve numaralı alanlar örneklerin temin edildiği illeri göstermektedir. 1: Kırklareli, 2: Edirne, 3: Çanakkale, 4: Bursa, 5: Adapazarı, 6: Kütahya, 7: Eskişehir, 8: Kastamonu, 9: Ankara, 10: Samsun, 11: Tokat, 12: Kayseri, 13: Gaziantep, 14: Elazığ, 15: Iğdır	19
Şekil 3.2. Tuzak bitki testi sonrası şeker pancarı bitkilerinin hasadı	22
Şekil 3.3. DAS-ELISA yönteminin uygulanması (A, B, C ve D).....	24
Şekil 3.4. Plastik kaplarda yetiştirilen bitkilerinin görünümleri	28
Şekil 3.5. Plastik bardaklara şaşırtılan bitkilerinin genel görünümleri	28
Şekil 3.6. Mekaniksel inokulasyon yönteminin uygulanması (A, B, C, D ve E).....	29
Şekil 4.1. İklim odasında tuzak bitli testi yöntemine göre yetiştirilen bitkilerin genel görünümü	34
Şekil 4.2. Tuzak bitki testi yöntemine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinin kılcal köklerinde belirlenen <i>Polymyxa betae</i> 'ya ait dinlenme spor yapılarının görünümü (A ve B).....	36
Şekil 4.3. Şeker pancarı köklerinden izole edilen toplam RNA'lar kullanılarak <i>P. betae</i> 'nin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), -C: Enfekteli olmayan şeker pancarı köklerinden elde edilen RNA'lar, 6: Aralık-Iğdır, 27: İslahiye-Gaziantep, 44: Merkez-Elazığ, 61: Vezirköprü-Samsun, 106: Niksar-Tokat, 125: Merkez-Edirne, 134: Babaeski-Kırklareli, 148: Yenişehir-Bursa, 150: Biga-Çanakkale, 225: Çifteler-Eskişehir, 281: Taşköprü-Kastamonu, 291: Erenler-Adapazarı, 524: Merkez-Kayseri, 602: Simav-Kütahya, 617: Ayaş-Ankara illerine ait şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneklerinden elde edilen RNA'lar]	36
Şekil 4.4. <i>P. betae</i> 'nin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), +C: 6 no (Aralık-Iğdır)'lu örneğe ait RNA, -C: sağlıklı şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneğinden elde edilen RNA, 27: İslahiye-Gaziantep, 225: Çifteler-Eskişehir].....	37

Şekil 4.5. P31 geninin RT-PCR yöntemi ile çoğaltılması [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), -C: sağlıklı şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneğinden elde edilen RNA, 6: Aralık-Iğdır, 27: İslahiye-Gaziantep, 44: Merkez-Elazığ, 61: Vezirköprü-Samsun, 125: Merkez-Edirne, 134: Babaeski-Kırklareli, 148: Yenişehir-Bursa, 150: Biga-Çanakkale, 281: Taşköprü-Kastamonu, 524: Merkez-Kayseri, 617: Ayaş-Ankara illerine ait şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneklerinden elde edilen RNA'lar]..... 38

Şekil 4.6. P31 geninin RT-PCR yöntemi ile amplifikasyonu [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), +C: 6 no (Aralık-Iğdır)'lu örneğe ait RNA, 27: İslahiye-Gaziantep, 125: Merkez-Edirne, 617: Ayaş-Ankara illerine ait şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneklerinden elde edilen RNA'lar.]..... 38

Şekil 4.7. BNYVV izolatlarının ve GenBank (NCBI) veri tabanında kayıtlı bazı BNYVV izolatlarının P31 genine göre nükleotit dizileri esas alınarak oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik analizde Maximum Likelihood yöntemi ve Tamura-Nei modeli kullanılmıştır. Dendogramda bootstrap değerleri, dallarda % olarak gösterilmiştir. Ölçek, aynı pozisyon için baz değişim miktarını göstermektedir (0.05). Referans izolatlara ait bilgiler Çizelge 4. 8'de yer almaktadır..... 47

Şekil 4.8. P31 genine göre BNYVV izolatlarında belirlenen grupların Türkiye şeker pancarı üretim alanlarında dağılımları (Grup II içerisinde yer alan BNYVV izolatının elde edildiği il kırmızı renk ile, Grup III içerisinde yer alan BNYVV izolatlarının elde edildiği iller ise sarı renk ile işaretlenmiştir)..... 48

Şekil 4.9. IGDR-6 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 51

Şekil 4.10. GZNP-27 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 52

Şekil 4.11. ELZG-44 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 53

Şekil 4.12. SMSN-61 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş;

diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisine alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 54

Şekil 4.13. TKAT-106 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisine alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 55

Şekil 4.14. EDRN-125 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisine alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 56

Şekil 4.15. KRKL-134 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisine alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 57

Şekil 4.16. BRSA-148 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisine alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 58

Şekil 4.17. CNKL-150 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisine alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 59

Şekil 4.18. ESHR-225 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisine alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 60

Şekil 4.19. KSTM-281 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N.*

benthamiana bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisine alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 61

Şekil 4.20. ADPZ-291 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisine alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 62

Şekil 4.21. KYSR-524 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisine alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 63

Şekil 4.22. KTHY-602 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisine alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 64

Şekil 4.23. ANKR-617 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisine alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)..... 65

Şekil 4.24. P31 geninin RT-PCR yöntemi ile amplifikasyonu [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), -C: sağlıklı şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneğinden elde edilen RNA, 6: Aralık-Iğdır, 27: İslahiye-Gaziantep, 44: Merkez-Elazığ, 61: Vezirköprü-Samsun, 134: Babaeski-Kırklareli, 150: Biga-Çanakkale illerine ait BNYVV izolatlarının *N. benthamiana*'ya aktarımı sonrasında bu bitkinin üst yapraklarından elde edilen RNA'lar] 68

Şekil 4.25. *Nicotiana benthamiana* bitkilerinden elde edilen BNYVV izolatlarında kılıf protein (CP) (A), P25 (B) ve P31 proteinlerinin (C) RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), 6-3: Aralık-Iğdır, 27-3: İslahiye-Gaziantep, 44-1: Merkez-Elazığ, 61-2: Vezirköprü-Samsun, 106-2: Niksar-Tokat, 125-2: Merkez-Edirne, 134-1: Babaeski-Kırklareli, 148-2: Yenişehir-Bursa, 150-3: Biga-Çanakkale, 225-1: Çifteler-Eskişehir, 281-2: Taşköprü-Kastamonu, 291-3: Erenler-Adapazarı, 524-1: Merkez-Kayseri, 602-3: Simav-Kütahya, 617-3: Ayaş-Ankara illerine ait BNYVV izolatları ile inokule edilen *N. benthamiana*'nın üst

yapraklarından elde edilen RNA'lar], <i>N. benthamiana</i> bitkilerinde kayıt edilen simptomlar (D).....	69
Şekil 4.26. <i>N. benthamiana</i> bitkilerine inokule edilen BNYVV izolatlarında P26 geninin RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), -C: sağlıklı şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneğinden elde edilen RNA, 6: Aralık-Iğdır, 125: Merkez-Edirne, 148: Yenişehir-Bursa, 281: Taşköprü-Kastamonu, 291: Erenler-Adapazarı, 524: Merkez-Kayseri, 602: Simav-Kütahya illerine ait inokule edilen <i>N. Benthamiana</i> 'nın üst yapraklarından elde edilen RNA'lar].....	71
Şekil 4.27. IGDR-6-3 izolatının <i>Nicotiana benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucunda bu bitkide oluşan cüceleşme (A) ile virüs-inokule edilen yaprak ucunda oluşan damarda belirginleşme belirtilerinin görünümü (B)	79
Şekil 4.28. GZNP-27-3 izolatının <i>Nicotiana benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucunda bu bitkide oluşan hafif cüceleşme (A) ile virüs-inokule edilen yapraklarda oluşan bombe ve yaprak ucunda oluşan iri klorotik lekelerin görünümü (B) (Kırmızı çerçeve içerisinde bitki RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)	79
Şekil 4.29. ELZG-44-1 izolatının <i>Nicotiana benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucunda bu bitkide oluşan belirgin cüceleşme (A) ile virüs-inokule edilen yapraklarda oluşan bombe ve yaprak damarlarında oluşan belirginleşme ve klorotik lekelerin görünümü (B)	80
Şekil 4.30. SMSN 61-1 izolatının <i>Nicotiana benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkinin yapraklarında oluşan kıvrılma (A) ile bazı yapraklarda gözlenen klorotik lekeler (B).....	80
Şekil 4.31. TKAT-106-2 izolatının <i>Nicotiana benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan belirgin cüceleşme (A) ile virüs-inokule edilen yapraklarda oluşan klorotik lekelerin görünümü (B)	81
Şekil 4.32. EDRN-125-2 izolatının <i>Nicotiana benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan belirgin cüceleşme belirtisinin görünümü	81
Şekil 4.33. KRLR-134-1 izolatının <i>Nicotiana benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan cüceleşme (A) ile virüs-inokule edilen yapraklarda oluşan klorotik lokal lezyonların görünümü (B).....	82
Şekil 4.34. BRSA-148-2 izolatının <i>Nicotiana benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan cüceleşmenin görünümü	82
Şekil 4.35. CNKL-150-3 izolatının <i>Nicotiana benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkinin genel görünümü	83
Şekil 4.36. ESHR-225-1 izolatının <i>Nicotiana benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan hafif cüceleşme belirtisinin görünümü	83
Şekil 4.37. KSTM-281-2 izolatının <i>Nicotiana benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan cüceleşme (A) ile virüs-inokulasyonu yapılmayan alt yapraklarda oluşan hafif mozaik ve damarlarda renk açılımı belirtisinin görünümü (B).....	84
Şekil 4.38. ADPZ-291-3 izolatının <i>Nicotiana benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkinin genel görünümü (A) ile virüs-inokulasyonu yapılmayan alt yapraklarda oluşan belirgin kıvrılma, hafif mozaik ve damarlarda renk açılımı belirtisinin görünümü (B).....	84

- Şekil 4.39. KYSR-524-1 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan belirgin cüceleşme (A) ile virüs-inokulasyonu yapılmayan alt yapraklarda oluşan belirgin içe bombe, damarlarda renk açılımı ve oluşan klorotik alanların görünümü (B) (Kırmızı çerçeve içerisine bitki RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir) 85
- Şekil 4.40. KTHY-602-3 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkinin genel görünümü (A) ile virüs-inokulasyonu yapılmayan alt yapraklarda oluşan hafif kloroz ve mozaik belirtisinin görünümü (B) 85
- Şekil 4.41. ANKR-617-3 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkinin genel görünümü (A) ile virüs-inokulasyonu yapılmayan alt yapraklarda oluşan hafif kloroz ve bombe belirtisinin görünümü (B) (Kırmızı çerçeve içerisine bitki RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir) 86
- Şekil 4.42. P31 geninin RT-PCR yöntemi ile amplifikasyonu [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), 27-3:Gaziantep, 524-1: Kayseri, 617-3: Ankara illerine ait BNYVV izolatlarının inokulasyonu sonrası *N. benthamiana* bitkilerinin üst yapraklarından elde edilen RNA'lar]..... 88
- Şekil 4.43. BRSA-148 izolatın mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *S. oleraceae* cv. Rick Zwan bitkisinin üst yapraklarında oluşturduğu bombe (A) ile bazı üst yapraklarda gözlenen nekrotik lokal lekeler (B) 90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya’da 2017 yılı şeker pancarı üretim verileri (Anonim, 2017)	2
Çizelge 1.2. Türkiye’de son 10 yıl içinde üretilen şeker pancarı üretim verileri (Anonim, 2018)	2
Çizelge 1.3. Türkiye’ de 2018 yılı içinde en fazla şeker pancarı üretimi yapan ilk on il (Anonim, 2018)	3
Çizelge 2.1. Şeker pancarında enfeksiyon oluşturan virüsler (Biancardi ve Lewellen, 2016)	5
Çizelge 2.1. BNYVV streyn tipleri ve bu streynlerin coğrafik dağılımları (Chiba vd, 2011; Zhou vd, 2015; Tamada vd, 2016)	10
Çizelge 2.2. BNYVV’nin tespit edildiği ülkelerin tarihsel sıralaması	12
Çizelge 3.1. Tuzak bitki testi çalışmalarında kullanılan toprak örneklerinin temin edildiği il, ilçe, köyler ile toprak örneklerine ait numaralar	20
Çizelge 3.2. Biyolojik çalışmalarda kullanılan test bitkileri ve temin edildiği yerler	20
Çizelge 3.3. Moleküler çalışmalarda kullanılan primerler, baz dizileri ve beklenen bant büyüklükleri	21
Çizelge 3.4. Mekanik olarak BNYVV ile inokule edilen <i>N. benthamiana</i> bitkilerinden moleküler çalışmalar için seçilen BNYVV izolatlarına ait veriler	30
Çizelge 4.1. Coğrafik orjinlerine göre seçilen toprak örneklerinde BNYVV’nin bulunma durumu ve bu bölgelere ait toprak örneklerinde tuzak bitki testi yöntemi ile yetiştirilen bitkilere ait bilgiler	35
Çizelge 4.2. BNYVV izolatlarına ai P31 proteininin nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)	40
Çizelge 4.3. BNYVV izolatlarının P31 gen bölgesinde farklılık belirlenen nükleotit pozisyonları	41
Çizelge 4.4. BNYVV izolatlarının dizi analizi yapılan P31 geninin nükleotit düzeyinde Dünya izolatları ile benzerlik oranları*	42
Çizelge 4.5. BNYVV izolatlarına ai P31 proteininin amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)	44
Çizelge 4.6. BNYVV izolatlarının P31 gen bölgesinde farklılık belirlenen amino asit pozisyonları	45
Çizelge 4.7. BNYVV izolatlarının dizi analizi yapılan P31 geninin amino asit düzeyinde Dünya izolatları ile benzerlik oranları* (%)	46
Çizelge 4.8. Filogenetik analizde kullanılan <i>Beet necrotic yellow vein virus</i> izolatları	47

Çizelge 4.9. BNYVV izolatların <i>N. benthamiana</i> bitkilerinin tekerrürlerinde oluşturduğu simptomlar ve ELISA testi sonuçları	50
Çizelge 4.10. Mekanik olarak BNYVV ile inokule edilen <i>N. benthamiana</i> bitkilerinden moleküler çalışmalar için seçilen BNYVV izolatlarına ait veriler	67
Çizelge 4.11. <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkilerinden izole edilen BNYVV izolatlarında genom segmentlerinden RNA-2 (CP), RNA-3 (P25), RNA-4 (P31) ve RNA-5 (P26)'in bulunma durumları	71
Çizelge 4.12. Şeker pancarı tuzak bitki kökleri (şeker pancarı) ve <i>N. benthamiana</i> bitkilerinin üst yapraklarından izole edilen BNYVV izolatlarının P31 proteinine göre nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları	73
Çizelge 4.13. Şeker pancarı tuzak bitki kökleri ve <i>N. benthamiana</i> bitkilerinin üst yapraklarından izole edilen BNYVV izolatlarının P31 gen bölgesinde farklılık belirlenen nükleotit pozisyonları	74
Çizelge 4.14. Şeker pancarı tuzak bitki kökleri ve <i>N. benthamiana</i> bitkilerinin üst yapraklarından izole edilen BNYVV izolatlarının P31 gen bölgesinde farklılık belirlenen amino asit pozisyonları	75
Çizelge 4.15. Şeker pancarı tuzak bitki kökleri ve <i>N. benthamiana</i> bitkilerinin üst yapraklarından izole edilen BNYVV izolatlarının P31 proteinine göre amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları	76
Çizelge 4.16. <i>N. benthamiana</i> 'dan elde edilen BNYVV izolatlarının <i>N. benthamiana</i> 'ya ikinci aktarımı sonucu test bitkilerinde gözlenen simptomlar ve ELISA testi sonuçları	78
Çizelge 4.17. BNYVV izolatlarının <i>N. benthamiana</i> bitkilerine I. ve II. aktarımları sonucu bitki boyunda gözlenen farklılıkların kıyaslanması	87
Çizelge 4.18. BNYVV izolatların <i>S. oleraceae</i> ve <i>B. vulgaris</i> bitkilerinde oluşturduğu simptomlar ve ELISA testi sonuçları	89

1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan şeker; Avrupa’da ve ülkemizde iklim koşullarından dolayı şeker pancarından (*Beta vulgaris* L.) elde edilebilmektedir. Şeker pancarı *Amaranthaceae* familyası içerisinde yer alan ekonomik öneme sahip bir kültür bitkisidir (Monteiro vd, 2013). Bu bitki, şeker üretiminin yanısıra, yan ürünleri olan küspe ve yaprak kısımlarından hayvan yemi olarak, melasından ise alkol ve ispirto elde edilmesinde kullanılmaktadır (Yardımcı vd, 2012). Ayrıca, şeker pancarı tarımının yapılması, makine üretimi, bitki koruma, sulama, gübreleme, hayvancılık, taşımacılık ve işçi istihdamı gibi sektörlerin de gelişmesine doğrudan büyük katkılar sağlamaktadır.

Şeker kamışı ve şeker pancarından elde edilen şeker arasında kalite bakımından bir farklılık bulunmamaktadır. Fakat kamışın pancara göre daha düşük maliyetlerle üretilmesi ve işlenmesi sebebi ile kamış şekerinin maliyeti pancar şekerine göre daha düşük olmaktadır. Ülkemizde dâhil olmak üzere Avrupa Birliği ülkeleri, Ukrayna ve Rusya gibi ülkeler şeker üretimlerini şeker pancarından; ABD, Çin ve Japonya gibi ülkeler hem pancardan, hem kamıştan; tropikal bölgelerde yer alan Brezilya, Hindistan, Meksika, Tayland ve Avustralya gibi birçok ülke ise şeker kamışından şeker üretmektedirler (Anonim, 2017).

2017 yılına ait Dünya’daki şeker pancarı üretim verileri incelendiğinde; ekim alanlarına göre Rusya’nın 11.747.190 dekar ile ilk sırayı aldığı ve Türkiye’nin ise 3.388.260 dekar ekim alanı ile beşinci sırada bulunduğu görülmektedir. Fakat Fransa’nın ekim alanına bakıldığında Almanya ve Amerika’ya göre daha az alanda üretim yapıyor olmasına rağmen, Fransa’nın birim alandan elde ettiği verimin daha yüksek olması sebebi ile üretim miktarının Almanya ve Amerika’dan yüksek olduğu görülmektedir. Dünya genelinde ise toplam 48.940.260 dekar alanda şeker pancarı üretimi yapılmaktadır (Anonim, 2017) (Çizelge 1. 1).

Çizelge 1.1. Dünya’da 2017 yılı şeker pancarı üretim verileri (Anonim, 2017)

ÜLKE ADI	ÜRETİM (ton)	EKİM ALANI (da)	Verim (ton/da)
RUSYA	51.933.000	11.747.190	4.42
FRANSA	34.381.000	3.887.800	8.86
ALMANYA	34.059.000	4.067.000	8.37
AMERİKA	32.046.000	4.508.700	7.10
TÜRKİYE	20.828.000	3.388.260	6.14
POLONYA	15.732.000	2.317.160	6.14
MISIR	12.106.000	2.367.320	5.11
DÜNYA	301.015.000	48.940.260	6.15

Türkiye’de son 10 yıl içerisinde üretilen şeker pancarının üretim verileri incelendiğinde, birim alandan elde edilen ortalama verim değerlerinin genel olarak her yıl arttığı görülmektedir. Fakat 2018 yılında ise verim değeri ve üretim miktarının 2017 yılına oranla azaldığı dikkat çekmiştir (Anonim, 2018) (Çizelge 1. 2).

Çizelge 1.2. Türkiye’de son 10 yıl içinde üretilen şeker pancarı üretim verileri (Anonim, 2018)

YILLAR	ÜRETİM MİKTARI (ton)	HASAT ALANI (da)	Verim (kg/da)
2009	17.274.674	3.239.704	5.332
2010	17.942.112	3.286.513	5.459
2011	16.126.489	2.938.411	5.488
2012	14.919.940	2.801.858	5.325
2013	16.488.590	2.909.097	5.668
2014	16.743.045	2.874.607	5.824
2015	16.022.783	2.739.912	5.848
2016	19.592.731	3.219.533	6.086
2017	21.149.020	3.388.829	6.241
2018	17.436.100	2.906.976	5.998

Türkiye’de 2018 yılı içerisinde 2.921.044 dekar alana şeker pancarı ekimi yapılmış olup 2.906.976 dekar alanda şeker pancarı hasatı yapılarak toplamda 17.436.100 milyon ton şeker pancarı üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim miktarları bakımından 5.079.242 milyon ton ile Konya ilk sırada ve 361.048 bin ton ile Kahramanmaraş ise onuncu sırada yer almaktadır (Anonim, 2018) (Çizelge 1. 3).

Çizelge 1.3. Türkiye’ de 2018 yılı içinde en fazla şeker pancarı üretimi yapan ilk on il (Anonim, 2018)

İLLER	EKİLEN ALAN (da)	HASAT EDİLEN ALAN (da)	ÜRETİM (ton)
Konya	731.688	731.458	5.079.242
Yozgat	264.597	262.876	1.444.994
Eskişehir	227.914	227.000	1.318.583
Aksaray	143.383	143.383	1.028.717
Kayseri	171.198	170.606	996.797
Sivas	129.775	129.446	679.983
Ankara	99.728	99.725	629.101
Karaman	77.017	77.017	554.380
Tokat	86.452	86.308	415.560
Kahramanmaraş	54.245	54.245	361.048
TÜRKİYE	2.921.044	2.906.976	17.436.100

Şeker pancarında, ekiminden hasat edilerek fabrikaya getirilmesine kadar olan yetiştirme periyodunda ve sonrasında ise depolanma sürecinde, biyotik ve abiyotik birçok etmen değişik seviyelerde kayıplara sebep olabilmektedir. Bu kayıplara neden olan etmenlerin başında bakteriyel, fungal ve viral hastalıklar gelmektedirler. Virüs kaynaklı hastalıklardan dolayı, zaman zaman üründe ve ürünün kalitesinde ciddi boyutlara ulaşan verim ve kalite kayıpları görülmektedir.

Şeker pancarı üretim alanlarında sorun oluşturan ve plasmodiophorid vektör *Polymyxa betae* Keskin ile taşınan en önemli toprak kökenli viral etmenler: *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV; Şeker pancarı nekrotik sarı damar virüsü), *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV; Şeker pancarı toprak kökenli mozayik virüsü), *Beet virus Q* (BVQ; Şeker pancarı Q virüsü) ve *Beet soil-borne virus* (BSBV; Şeker pancarı toprak kökenli virüsü)’dür (Smith, 1972; Mouhanna vd, 2002; Lennefors, 2006).

Dünya’da BNYVV tarafından oluşturulan ve "rhizomania" olarak adlandırılan hastalık, şeker pancarı üretim alanlarında verimi olumsuz şekilde etkileyen en önemli toprak kökenli virus hastalıklarının başında gelmektedir.

Bu tez çalışmasında, Türkiye’nin farklı coğrafik bölgelerinden elde edilmiş olan ve BNYVV ile bulaşık olduğu bilinen 15 toprak örneği kullanılarak, tuzak bitki testi yöntemine göre BNYVV izolatlarının yeniden çoğaltımı sağlanmıştır. Şeker pancarı köklerinde *P. betae*’nın varlığı mikroskobik olarak ve *Polymyxa betae*’ya spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ile belirlenmiştir. Ayrıca, on BNYVV izolatının,

virüsün vektör *P. betae* ile etkin olarak taşınmasında rol oynayan RNA-4 üzerinde yer alan P31 geninin moleküler olarak karakterize edilmesine çalışılmıştır. Böylelikle, izolatlar arasında coğrafik orjinlerine bağlı olarak moleküler yönden farklılık olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. İlave olarak, 15 BNYVV izolatının virüsün sistemik konukçusu olan *Nicotiana benthamiana*'ya mekanik yolla aktarımı yapılarak, bu model bitkide BNYVV'nin farklı RNA segmentlerine ait gen bölgelerinin (CP, P25, P26 ve P31) bulunma durumları irdelenmeye çalışılmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Dünya’da şeker pancarında verimi olumsuz etkileyen, fungal, bakteriyel ve viral kaynaklı toplam 82 hastalıktan, 51’i ülkemizde sorun oluşturmaktadır (Özgür, 2003). Viral hastalıklar şeker pancarında önemli bir yere sahiptir. Dünya’da şeker pancarı üretim alanlarında enfeksiyona neden olan ve yaygın olarak görülen virüsler Çizelge 2. 1.’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Şeker pancarında enfeksiyon oluşturan virüsler (Biancardi ve Lewellen, 2016)

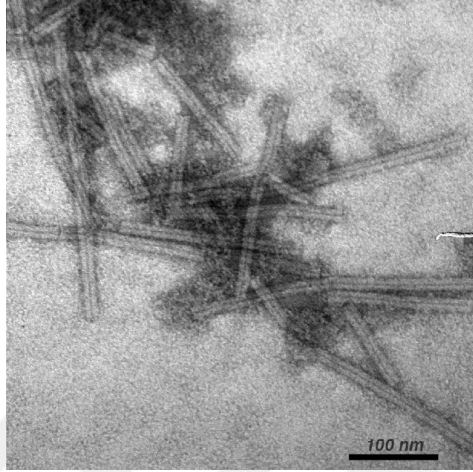
Virüs Adı	Cins	Familya	Vektör
<i>Beet curly top virus</i> (BCTV)	<i>Curtovirus</i>	Geminiviridae	<i>Circulifer tenellus</i>
<i>Beet leaf curl virus</i> (BLCV)	<i>Nucleorhabdovirus</i>	Rhabdoviridae	<i>Piesma quadrata</i>
<i>Beet yellows virus</i> (BYV)	<i>Closterovirus</i>	Closteroviridae	<i>Myzus persicae</i> <i>Aphis fabae</i>
<i>Beet mild yellows virus</i> (BMV)	<i>Polerovirus</i>	Luteoviridae	<i>Myzus persicae</i>
<i>Beet western yellows virus</i> (BWV)	<i>Polerovirus</i>	Luteoviridae	<i>Myzus persicae</i>
<i>Beet chlorosis virus</i> (BChV)	<i>Polerovirus</i>	Luteoviridae	<i>Myzus persicae</i>
<i>Beet mosaic virus</i> (BtMV)	<i>Potyvirus</i>	Potyviridae	<i>Myzus persicae</i> <i>Aphis fabae</i>
<i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (BNYVV)	<i>Benyvirus</i>	Benyviridae	<i>Polymyxa betae</i>
<i>Beet soil-borne mosaic virus</i> (BSBMV)	<i>Benyvirus</i>	Benyviridae	<i>Polymyxa betae</i>
<i>Beet soil-borne virus</i> (BSBV)	<i>Pomovirus</i>	Virgaviridae	<i>Polymyxa betae</i>
<i>Beet virus Q</i> (BVQ)	<i>Pomovirus</i>	Virgaviridae	<i>Polymyxa betae</i>
<i>Beet oak-leaf virus</i> (BOLV)	<i>Varicosavirus</i>	Rhabdoviridae	<i>Polymyxa betae</i> ?
<i>Beet black scorch virus</i> (BBSV)	<i>Betaneovirus</i>	Tombusviridae	<i>Olpidium brassicae</i>

Bu virüslerden; *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV)’ün neden olduğu rhizomania hastalığı şeker pancarında ekonomik olarak zarara neden olan en önemli viral hastalıktır (Scholten ve Lange, 2000). Bunun nedeni; hastalığın şeker pancarı üreten tüm ülkelerde bulaşık olmayan alanlara halen devam eden yayılımı (McGrann vd, 2009), toprakta uzun süre kalması ve şeker pancarı verimini % 80’den fazla azaltabilecek potansiyel bir zarara sahip olabilmesindedir (Peltier vd, 2008).

2.1. Virüsün Morfolojisi, Taksonomisi ve Genomik Özellikleri

BNYVV, pozitif duyarlı tek sarmal RNA içeren dört ya da beş adet düz çubuk şeklinde partiküllerden meydana gelmektedir (Putz, 1977; Tamada vd, 1989) (Şekil 2. 1). BNYVV ilk başta *Furovirus* cinsinin üyeleri içerisinde alınmış olmasına rağmen, 1997

yılında International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) tarafından *Benyvirus* cinsinin üyelerinin içerisinde dâhil edilmiştir (Pferdmenges, 2007). Son yapılan araştırmalar sonucunda ise BNYVV'nin *Benyviridae* familyası içerisinde yer alan *Benyvirus* cinsinin bir üyesi olduğu bildirilmiştir (Gilmer ve Ratti, 2017).

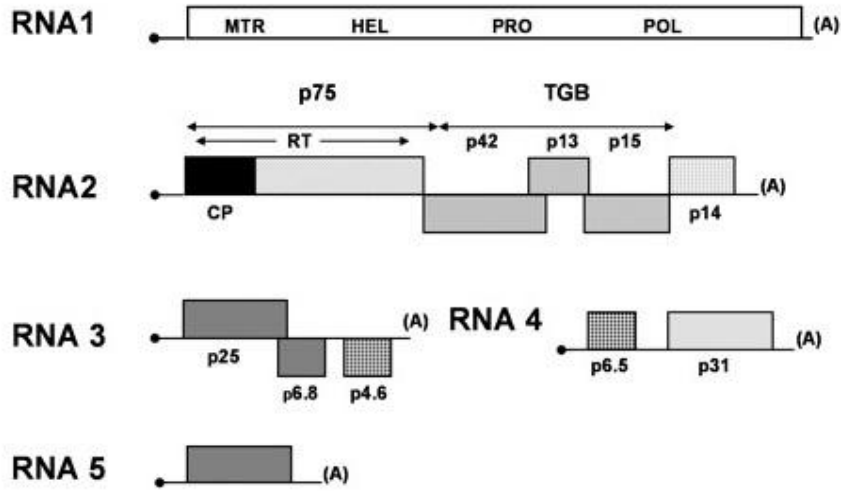


Şekil 2.1. BNYVV partiküllerinin elektron mikroskoptaki görünümü (M. Erhardt, IBMP)

Doğal olarak enfeksiyona yakalanmış şeker pancarı köklerinde BNYVV'nin dört genomik RNA segmentine (RNA-1, RNA-2, RNA-3 ve RNA-4) sahip olduğu saptanmıştır (Koenig vd, 1986). Ayrıca, bazı BNYVV izolatlarının beşinci RNA segmentini de içerdiği tespit edilmiştir (Tamada vd, 1989; Koenig ve Lennefors, 2000; Harju vd, 2005). RNA-1, 6.746 nükleotitten oluşmaktadır. Bu segment replikasyonla ilgili tek bir ORF (Open reading frame: açık okuma çerçevesi) içermekte ve 237 kDa'luk bir polipeptidi kodlamaktadır (Van Regenmortel vd, 2000). Bu polipeptid'den sırasıyla metil transferaz (MTR), helikaz (HEL), proteaz (PRO) ve RNA polimeraz (POL) enzimleri kodlanmakta olup virüs replikasyonunda bu proteinler görev almaktadır (Bouzoubaa vd, 1987) (Şekil 2. 2).

RNA-2 segmenti, 4.612 nükleotit büyüklüğünde ve altı adet ORF'den meydana gelmektedir (Bouzoubaa vd, 1986) (Şekil 2. 2). İlk iki ORF (p21 ve p75), kılıf protein readthrough bölgesini meydana getirmektedir. Bu bölge virüs partiküllerinin bir arada tutulması ve vektör ile taşınma ile ilgili bölgeyi içermektedir. RNA-2'nin tam merkezinde bulunan ve üçlü gen bloğu bölgesi (TGB) olarak isimlendirilen bölge ise p42, p13 ve p15 proteinlerinden oluşmaktadır. Bu proteinler kendi aralarında

birbirleriyle etkileşime girerek, viral RNA'ların hücreden hücreye taşınmasını sağlamaktadırlar (Gilmer vd, 1992). P42 proteini, viral RNA'ları birbirine bağlamaktadır (Bleykasten vd, 1996). Diğer p13 ve p15 proteinleri ise plasmodesmatanın geçirgenliğini değiştirerek viral RNA'ları hücreden hücreye taşınmasında rol oynamaktadır (Lauber vd, 1998a). RNA-2 üzerindeki son ORF ise, p14 proteinini kodlamaktadır. Bu protein ise konukçu bitkide RNA susturulmasının (RNA silencing) baskılanmasında görev almaktadır (Dunoyer vd, 2002) (Şekil 2. 2).



Şekil 2.2. BNYVV'nin genomik bileşenleri (McGrann vd, 2009)

RNA-3, 1.775 nükleotitten oluşmakta olup, bu segment üç ORF'den meydana gelmektedir (Bouzoubaa vd, 1985). RNA-3'ün ilk ORF'sinden 25 kDa'luk P25 proteini kodlanmaktadır. P25 proteini simptom oluşumu ve BNYVV'nin patojenitesinde rol oynamakta ve özellikle 67-70. pozisyonlardaki amino asitlerde (aa) büyük bir varyasyon belirlendiğinden dolayı, bu bölgedeki aa'ler aşırı değişken tetrat (hipervariable tetrat) olarak isimlendirilmektedir (Koenig vd, 1991). Bu proteinde en fazla farklılığın gözlendiği aa'in ise 68. pozisyonda yer alan aa olduğu bildirilmektedir (Schirmer vd, 2005). Bu varyasyonlar, farklı izolatların patojenitesini etkilemekte ve farklı tip izolatların ayırt edilmesine olanak sağlamaktadır (Schirmer vd, 2005; Rush vd, 2006). İmmune-gold elektron mikroskop tekniği ile P25'in enfekteli hücrelerin hem çekirdeği, hem de stoplazmasında lokalize olduğu belirlenmiştir (Haeberle ve Stussi-Garaud, 1995). Bu segmentin (RNA-3) 2. ORF'sinden yine virüsün patojenitesi

ve uzun mesafelere taşınmasından sorumlu N proteini (6.8 kDa) ve son ORF'den ise p4.6 (4.6 kDa) proteini kodlanmaktadır (Bouzoubaa vd, 1985; Tamada vd, 1989) (Şekil 2. 2). Ayrıca, RNA-3'ün virüsün kök dokularında yayılma ve çoğalmasında da rol oynadığı bildirilmiştir (Tamada vd, 1990; Jupin vd, 1991; Koenig vd, 1991). P25 proteinin, şeker pancarı köklerinde, *Chenopodium quinoa* (Kinoa) ve *Tetragonia expansa* (Yeni Zelanda ıspanağı) gibi indikatör bitkilerin yapraklarında simptom oluşumuna da neden olduğu belirtilmektedir (Tamada vd, 1989; Jupin vd, 1992; Pferdmenges, 2007). Jupin vd (1992), mutasyona uğramış veya silinmiş P25 proteinine sahip BNYVV izolatlarını mekanik inokulasyon yöntemi ile *C. quinoa* ve *T. expansa* bitkilerinin yapraklarına bulaştırmışlar ve bu mutant izolatların yabancı tip BNYVV izolatlarına göre daha hafif simptom oluşumuna sebep olduklarını bildirmişlerdir. Koenig (2008) ise, nükleositol plazmik hareket için 169, 172, 175 ve 178. pozisyonlarda valin aa'sinin bulunması gerektiğini saptamış ve hareket yeteneğinden yoksun BNYVV izolatlarının, *C. quinoa* bitkisinde klorotik lokal lezyon oluşumuna sebep olamadıklarını belirtmiştir.

RNA-4 segmenti, 1.431 nükleotit uzunluğunda olup, 31 kDa'luk P31 proteinini kodlamaktadır (Bouzoubaa vd, 1985) (Şekil 2. 2). BNYVV'nin, *P. betae* tarafından etkili bir şekilde taşınması için RNA-4'ün gerekli olduğu bildirilmiştir (Tamada ve Abe 1989; Rahim vd, 2007). Rahim vd (2007), *Nicotiana benthamiana* L. bitkilerinde, şiddetli simptom oluşumunun RNA-3'ten ziyade, RNA-4 ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar, bu proteinin şeker pancarı köklerinde post transcriptional gene silencing (PTGS)'in bastırılması ve patojeniteden de sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (Rahim vd, 2007).

RNA-5, 1342-1347 nükleotitten oluşmakta olup, bu segment üzerinde yer alan tek ORF'den 26 kDa'luk P26 proteinini sentezlemektedir (Kiguchi vd, 1996) (Şekil 2. 2). RNA-5'in nükleotit uzunluğunun BNYVV izolatları arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır (Koenig vd, 1997; Miyanishi vd, 1999; Zhuo vd, 2015). RNA5, köklerde oluşan simptomların daha şiddetli hale gelmesinde rol oynamakta ve virüsün daha agrasif hale gelmesine neden olduğu belirtilmektedir (Tamada vd, 1996). Ayrıca, RNA-5'in, *Beta macrocarpa*'da sistemik enfeksiyon oluşumu ile ilişkisinin olduğu belirtilmekle birlikte; RNA-3'ten daha az bir etkisinin olduğu ifade edilmektedir (Tamada vd, 1989). Dünya'da, Fransa (Koenig vd, 1997), Kazakistan (Koenig ve

Lennefors, 2000), İngiltere (Harju vd, 2002; Ward vd, 2007), Çin (Koenig vd, 2008), Japonya (Tamada vd, 1996; Miyanishi vd, 1999), Almanya (Koenig vd, 2008) ve son olarak da Türkiye'den bazı BNYVV izolatlarının RNA-5'i içerdiği bilinmektedir (Kutluk Yılmaz vd, 2016a).

2.2. Streyn Tipleri

1994'lü yıllarda; Avrupa'daki BNYVV izolatları RFLP, SSCP ve baz dizisi analizleri ile A-, B- ve P-tipi olmak üzere üç streyn grubuna ayrılmıştır (Kruse vd, 1994; Koenig vd, 1995). A- ve B-tip BNYVV izolatları dört RNA segmentine sahip olup, kılıf protein geninin 62, 103 ve 172. pozisyonlarındaki aa'lerdeki farklılıklar A- (T₆₂S₁₀₃L₁₇₂) ve B- tip (S₆₂N₁₀₃F₁₇₂) streynlerin ayırımına olanak sağlamaktadır (Miyanishi vd, 1999). A-tip BNYVV izolatları Dünya'da yaygın olarak görülürken (Schirmer vd, 2005), B-tip streyn Avrupa'da sınırlı alanlarda (Koenig vd, 2008), Japonya (Miyanishi vd, 1999) ve Çin (Li vd, 2008)'de tespit edilmiştir. Daha sonra, Schirmer vd (2005) BNYVV RNA-5 içeren P-tip streynin Avrupa (P-tip streyn) ve Asya (J-tip streyn) olmak üzere iki alt gruba ayrıldığını, P26 proteini nükleotit dizi analizlerindeki farklılıklar ile belirlemişlerdir. Nitekim, P26 protein geni baz dizisindeki iki bölgedeki silinme (pozisyon 77, 227-229) RNA-5 içeren izolatların Asya P-tipi P26 protein (J-tip) ve Avrupa P-tipi P26 protein (P-tip) olarak ayırımını sağlamaktadır (Schirmer vd, 2005). Böylece, BNYVV'nin streyn sayısı dörde ulaşmıştır (A, B, P ve J). P- ve J-tip streynler beş RNA segmenti içermektedir. P-tip streyn, 1970'li yıllarda ilk olarak Fransa'da Pithiviers bölgesinden izole edilmiş (Koenig vd, 1997) olup, daha sonra Kazakistan (Koenig ve Lennefors, 2000), İngiltere (Ward vd, 2007) ve İran (Mehrvar vd, 2009)'da rapor edilmiştir. J-tip streyn ise; Çin (Li vd, 2008), Japonya (Chiba vd, 2011) ve Türkiye (Kutluk Yılmaz vd, 2016a)'de yaygın olarak görülmekle birlikte; Almanya'da tek bir pancar tarlasında varlığı tespit edilmiştir (Koenig vd, 2008). Şu ana kadar yapılan çalışmalarla ülkemizde A- ve J-tip streynlerin bulunduğu rapor edilmiştir (Kruse vd, 1994; Kutluk Yılmaz vd, 2007, Kutluk Yılmaz vd, 2010; Kutluk Yılmaz vd, 2016a).

Diğer taraftan, 2003 yılından beri yürütülen bazı araştırmalara göre; BNYVV'nin bu dört ana streyn grubuna ilave olarak yeni streynlerin olabileceğine dair bulgular kayıt edilmiştir. Lemaire vd (2003), 2001 yılında Fransa'nın Pithiviers

bölgesinde özellikle ‘Holly’ genotipini içeren (*Rz1* dayanıklılık geni) tolerant çeşitlerde şiddetli BNYVV simptomlarını rapor etmiş ve bölgede RNA-5 içermeyen P-tipi benzeri (“P-type like-RNA-5”) yeni izolatların varlığını bildirmişlerdir. Bu P-tipi benzeri izolatların sadece dört temel genomik RNA içermekle birlikte, simptom oluşumu ile ilgili olarak izolatların çoğunun P25 proteini 67-70. aa pozisyonlarında ‘AHHG’, ‘AFHR’ motifine sahip olduğu ve ‘AYHR’ tetrad motifi içeren A- ve B-tipi izolatlar ile karşılaştırıldığında, bu izolatların daha patojenik oldukları belirlenmiştir (Lemaire vd, 2003). Bunu takiben, Amerika (Liu ve Lewellen, 2007) ve İran (Mehrvar vd, 2009)’da RNA-5 içermeyen, fakat P-tipi P25 tetrad motifine (SYHG) sahip yeni BNYVV izolatları da rapor edilmiştir. Daha sonraki yıllarda ise, Peltier vd (2008) dört genomik RNA içeren A-tip streyn’de ‘AYPR’ şeklindeki P25 tetrad motifi belirlemiş ve bunu yeni bir BNYVV streyni olarak bildirmiştir.

Çizelge 2.1. BNYVV streyn tipleri ve bu streynlerin coğrafik dağılımları (Chiba vd, 2011; Zhou vd, 2015; Tamada vd, 2016)

Original Tip	Streyn Tipi	CP	P25	P31	RNA-5*	Coğrafik Dağılım
A-I	Çin-H	A ya da B	I	I	+	Çin, Japonya, İngiltere
A-I	Çin-Y	A ya da B	I	I	+	Çin
A-II	Fransa-P (P tip)	A	II	II	+	Fransa, Kazakistan, İngiltere, İran
A-II	Japon-D	A	II	II	+	Japonya
A-II	Japon-O	A	II	I ya da II	+	Japonya
A-II	Çin-B	A ya da B	II	II	+	Çin, Almanya
A-II	Çin-L	B	II	I	+	Çin
A-III	İtalya (Avrupa A-tip)	A	I	III	-	Avrupa, Amerika, Orta Doğu
B	Çin-X	A	III	I ya da III	+	Çin
B	Almanya (B-tip)	B	III	IV	-	Almanya, Fransa, Belçika, Avusturya, İsviçre, Çekya, Çin

* + = RNA-5 var, - = RNA-5 yok

Daha sonra, BNYVV izolatlarının streyn ayırımındaki kompleks durumu daha net bir şekilde açıklığa kavuşturmak amacıyla; ilk olarak Schirmer vd (2005), çoğunluğu Avrupa’dan elde edilen BNYVV izolatlarını kılıf protein (CP) (RNA-2), P25 (RNA-3) ve P26 (RNA-5) genine göre analiz etmişlerdir. Daha sonra, Chiba vd (2011) ise, çoğunluğunu Asya izolatlarının oluşturduğu 73 BNYVV izolatının bu üç gene (CP, P25 ve P26) ilave olarak, P31 (RNA-4) genini de detaylı olarak

incelemişlerdir. Bu çalışmalar sonucunda; BNYVV izolatlarının CP genine göre iki (A-tip ve B-tip), P25 genine göre üç (P25-I, P25-II ve P25-III), P31 genine göre dört (P31-I, P31-II, P31-III ve P31-IV) ve P26 genine göre ise üç (P26-I, P26-II ve P26-III) gruba ayrıldığını bildirmişlerdir (Schirmer vd, 2005; Chiba vd, 2011). Ana proteinler esas alınarak (CP, P25 ve P31) (reassortant'lar hariç) birlikte analiz gerçekleştirildiğinde ise; BNYVV izolatlarının dört ayrı klada (A-I, A-II, A-III ve B) ayrıldığı saptanmıştır. Bu gruplandırmaya göre; A-I'de Çin-H ve Çin-Y streynleri, A-II'de Fransa-P (P tip), Japon-D, Japon-O, Çin-B ve Çin-L streynleri, A-III'de İtalyan streyni (Avrupa A-tip) ve B'de ise Çin-X ve Alman (B tip) streynlerinin yer aldığı bildirilmiştir (Chiba vd, 2011; Zhuo vd, 2015; Tamada vd, 2016). Bu araştırmacılar, BNYVV populasyonları için filogenetik evrimsel yollu, farklı coğrafik dağılıma sahip 10 farklı grup teklif etmişlerdir. Böylelikle, günümüzde BNYVV'nin streyn sayısı 10'a ulaşmıştır (Çizelge 2. 1).

Bugün RNA-5 içeren BNYVV izolatlarının evrimsel gelişimi üzerinde farklı hipotezler ortaya atılmış bulunmaktadır. Tamada vd (2003), bazı A-tip BNYVV izolatlarının RNA-5'i sonradan kazanarak P-tip streyne dönüştüğünü ifade etmektedirler. Diğer taraftan, Chiba vd (2011) ise, BNYVV'nin yayılma rotası ve evrimsel tarihini açıklamak amacıyla yürüttükleri araştırma sonucunda; BNYVV'nin öncelikle A- ve B-tip streyn olarak ayrıldığını ve sonradan A-tip populasyonların bazılarının RNA-5 genom parçasını kaybettiğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar, rhizomania problemi yaşanan Dünya'nın farklı bölgelerinden topladıkları toprak örnekleri ile yürüttükleri araştırma sonucunda; BNYVV'nin orjininin Doğu Asya olduğunu ve en büyük genetik farklılığın ise Japon ve Çin izolatlarında görüldüğünü bildirmişlerdir (Chiba vd, 2011).

2.3. Coğrafik Dağılımı

BNYVV ilk olarak Canova (1959) tarafından 1953 yılında İtalya'da rapor edilmiştir. Takiben, Japonya, Fransa (Putz ve Vuittenez, 1974), Almanya (Hamdorf vd, 1977) ve Yunanistan (Kouyeas, 1979)'da da BNYVV'nin varlığı tespit edilmiştir. Ardından, 1978'de Çin (Gao vd, 1983; Li vd, 2008) ve 1981'de ise ABD'de (Al Musa ve Mink, 1981) kayıt edilmiştir. Ülkemizde ise, BNYVV ilk olarak Koch tarafından, 1987 yılında Amasya Şeker Fabrikası'nın Erbaa ve Taşova bölgeleri ile Alpullu Şeker

Fabrikası'nın Keşan ve Uzunköprü bölgelerinde pancar üretim alanlarında tespit edilmiştir (Koch, 1987). Son yıllarda, Güney Afrika ve Brezilya'da kırmızı pancar (*B. vulgaris* subsp. *vulgaris* cv. Boro) üretim alanlarında BNYVV'nin varlığı bildirilmiştir (Roberts vd, 2015; Rezende vd, 2015). BNYVV'nin tespit edildiği ülkelerin tarihsel olarak sıralaması Çizelge 2. 2'de verilmiştir (Asher, 1993; Rush vd, 2006; McGrann vd, 2009; Roberts vd, 2015; Rezende vd, 2015).

Çizelge 2.2. BNYVV'nin tespit edildiği ülkelerin tarihsel sıralaması

ÜLKE	YIL	ÜLKE	YIL
İtalya	1953	İsviçre	1983
Japonya	1965	Belçika	1984
Hırvatistan	1971	İngiltere	1987
Fransa	1971	TÜRKİYE	1987
Yunanistan	1972	İspanya	1988
Almanya	1974	İsveç	1997
Çek Cumhuriyeti	1978	Suriye	1998
Çin	1978	Slovenya	1999
Slovakya	1978	Danimarka	2000
Avusturya	1979	Şili	2001
Kazakistan	1979	Polonya	2002
Romanya	1979	Litvanya	2002
Rusya	1979	Kanada	2002
Ukrayna	1979	Mısır	2003
ABD	1981	İran	2004
Macaristan	1982	Fas	2005
Bulgaristan	1983	Brezilya (kırmızı pancar)	2015
Hollanda	1983	Güney Afrika (kırmızı pancar)	2015

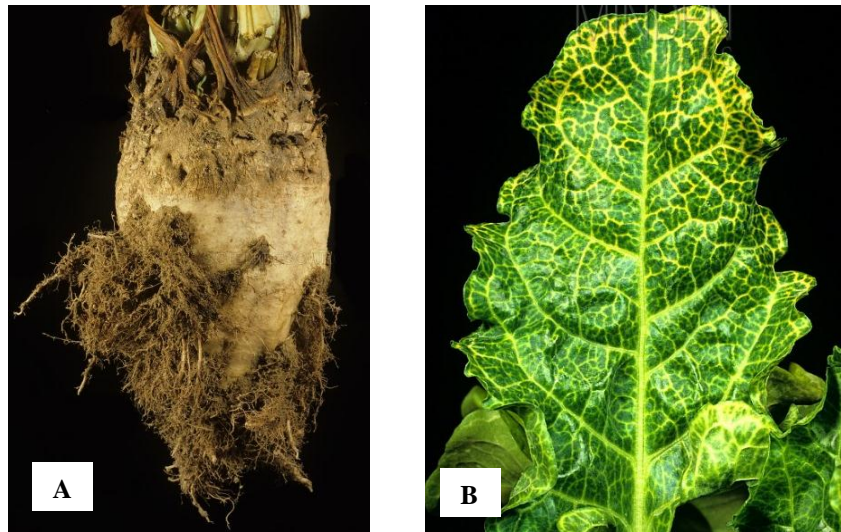
2.4. Simptomatoloji ve Konukçu Çevresi

Hastalık tarlada yer yer renk açılımı gösteren bitki adacıkları şeklinde göze çarpmaktadır (Şekil 2. 3). Bu görüntü aşırı azot uygulanan veya sulanmayan tarlalarda gizlenebilmektedir. Enfekteli bitkilerin yapraklarının rengi açılarak fıstık yeşili bir renk almakta ve aşırı yan kök gelişiminden dolayı köklerde sakallanma (Şekil 2. 4A) oluşmaktadır (Özgür, 2003). Ayrıca, yumruların iletim demetlerinde sarı-kahverengi renk oluşumu gözlenmekte ve enfekteli bitkilerde kök zararlanması nedeniyle bitkiler yeterli suyu alamamakta, bunun sonucunda da bitkiler gece normal bir görünüm sergilese bile, gün içerisinde solgunluk oluşabilmektedir. Hatta şiddetli enfeksiyonlarda (fide dönemi enfeksiyonu gibi) bitkiler cüce kalmakta ve

ölebilmektedirler. Bu durumda kök ucu küçük kalmakta ve aşırı lateral kökler oluşturmaktadır. Bu belirtiler mevcut olduğunda, bazen yaprak damarları boyunca parlak sarı alanlar (virüse ismini veren nekrotik sarı damar belirtisi) (Şekil 2. 4B) oluşabilmektedir. Zayıf ya da geç dönemde oluşan enfeksiyonlarda, yumrular turp şeklini almakta ve lateral köklerde çoğalma olmaktadır. Çok zayıf enfeksiyonda ise, kök ve yapraklarda herhangi bir belirti oluşmayabilmektedir (Tamada, 2016).



Şekil 2.3. Hastalığın tarlada görünümü ve renk adacıklarının oluşumu (Poimenopoulou, 2017)



Şekil 2.4. Rhizomania'lı şeker pancarı köklerindeki sakal görünümü (A) ile yaprakta oluşan nekrotik sarı damar belirtisi (B) (Anonim, 2019)

BNYVV'nin doğada; şeker pancarı (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*), hayvan pancarı, pazı (*Beta vulgaris* var. *cicla*) ve ıspanakta (*Spinacia oleracea*) enfeksiyon oluşturduğu belirtilmektedir (Tamada, 2016). Son yıllarda; Dünya'da ilk kez ülkemizde, BNYVV ve vektör *P. betae*'nin şu ana kadar bilinen konukçuları dışında, *Brassicaceae* familyasının bir üyesi olan *Raphanus raphanistrum* L.'da da doğal koşullarda enfeksiyon oluşturduğu belirlenmiştir (Kutluk Yılmaz vd, 2016b).

BNYVV bitki öz suyunun mekanik inokulasyonu yöntemi ile *Chenopodiaceae* familyasında yer alan bitkilerin birçoğuna, *Aizoaceae*, *Solanaceae*, *Caryophyllaceae* ve *Amaranthaceae* familyasında yer alan birkaç bitki türüne taşınabilmektedir (Tamada ve Baba, 1973; Kuszala ve Putz, 1977; Horváth, 1994; Hugo vd, 1996). Virüs, genellikle konukçu bitkilerin sadece inokulasyon yapılan yapraklarında sınırlı kalmaktadır. Nitekim, *C. quinoa* ve *T. expansa* BNYVV'nin lokal lezyon konukçuları arasında yer almaktadır. Bununla birlikte; BNYVV, *Beta macrocarpa*, *Beta vulgaris* subsp. *maritima* M8, *S. oleracea* ve *N. benthamiana* bitkilerinde ise sistemik enfeksiyon oluşturmaktadır (Tamada, 1975; 2002; 2007). Sistemik konukçularından; *N. benthamiana* ve *S. oleracea*'da BNYVV'nin genom segmentlerinden sadece RNA-1 ve RNA-2 enfeksiyon için yeterli olmakta, diğer segmentlere ise mutlak gerek duyulmamaktadır (Lauber vd, 1998a; Lauber vd, 1998b; Andika vd, 2005). RNA-3 segmenti üzerinde yer alan P25 proteini, BNYVV'nin doğal konukçularında klasik rhizomania belirtilerininin oluşabilmesi için gereklidir. Ayrıca, *T. expansa* gibi farklı lokal lezyon konukçularında ve doğal konukçusu olan *Beta* türlerinde şiddetli sarı lokal lezyon oluşumundan sorumludur (Tamada vd, 1989; Tamada vd, 1999; Jupin vd, 1992). RNA-3 segmenti üzerinde bulunan N proteini ise, şeker pancarında nekrotik simptom oluşumunda görev almaktadır (Chiba vd, 2008; Jupin vd, 1992). Ayrıca, *B. macrocarpa*'da BNYVV'nin sistemik taşınmasında RNA-3'ün çekirdek (core) bölgesi görev almaktadır (Lauber vd, 1998b).

2.5. Zararı ve Ekonomik Önemi

Şeker pancarı yetiştiriciliğini tehdit eden ve engelleyen unsurlarının en başında, rhizomania hastalığının geldiği belirtilmektedir (Scholten ve Lange, 2000). Rezaei vd (2014), BNYVV ile enfekteli olan ve olmayan arazilerde yürüttükleri denemenin sonucu olarak, bulaşık alanlardaki bitkilerin yaprak alan endeksinin % 24, kuru madde

miktarının ise % 54 oranında düştüğünü bildirmişlerdir. Rhizomania'nın şiddetli olarak görüldüğü arazilerde yetiştirilen şeker pancarlarında, verim kaybının % 30'dan daha fazla olduğu belirtilmiştir (Winner, 1984). Rhizomania hastalığının, bitkinin kök oluşturmasında % 90, şeker içeriğinde ise % 10 oranında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Lennefors, 2006). Ayrıca, Kaya (2009), hastalığın şeker veriminde % 90 oranında azalmaya neden olduğunu rapor etmiştir.

2.6. Vektör *Polymyxa betae*

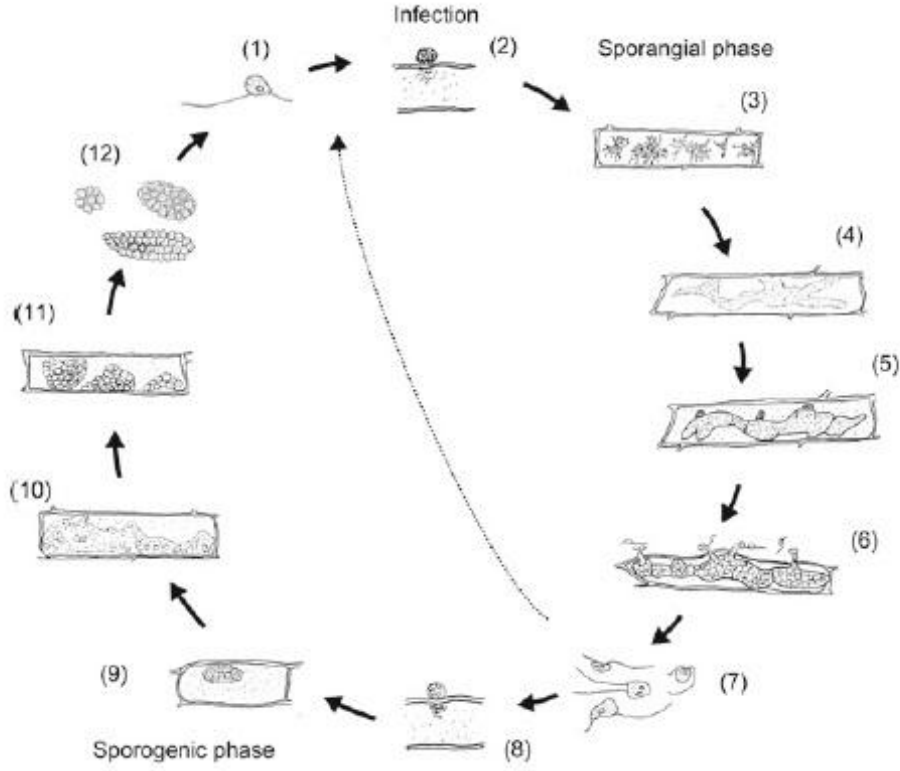
Polymyxa betae ilk olarak Dr. Bahattin Keskin tarafından teşhis edilmiş ve *P. betae* Keskin olarak adlandırılmıştır (Keskin, 1964). Önceleri funguslar alemi içerisinde yer alan bu tür, son taksonomik gruplandırma ile Protozoa alemi içerisine yerleştirilmiştir (Kirk vd, 2001).

Polymyxa betae, Plasmodiophoracea familyasının bir üyesi olup, bu familya içerisinde 10 cinse ait (*Polymyxa*, *Spongospora*, *Plasmodiophora*, *Ligniera*, *Membranosorus*, *Octomyxa*, *Sorodiscus*, *Sorosphaerula*, *Tetramyxa* ve *Woronina*) 41 tür tanımlanmıştır (Neuhauser vd, 2010, 2011). İlk üç türün (*Polymyxa*, *Spongospora* ve *Plasmodiophora*) üyeleri tarımsal açıdan büyük öneme sahiptirler. rDNA bölgesinin filogenetik analizleri, *Polymyxa* cinsinin *Ligniera* ve *Sorosphaerula* ile çok yakın ilişkili, *Spongospora* ve *Plasmodiophora* ile ise daha uzak ilişkili olduğunu göstermiştir (Ward ve Adams, 1998; Bulman vd, 2001). *Polymyxa* cinsi morfolojik olarak ayırımı yapılamayan, ancak konukçu çevresine göre ayrılabilen iki türü içermektedir. Bu türler; *P. betae* ve *P. graminis*'tir (Barr, 1979; Barr ve Asher, 1992; Braselton, 2001). *P. graminis*; Gramineae familyasına ait bitki türlerinde enfeksiyon oluştururken, *P. betae* ise Chenopodiaceae familyası ve ilgili bazı bitkilerde enfeksiyon oluşturmaktadır. Bu iki tür, rDNA analizi ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Ward vd, 1994; Ward ve Adams, 1998)

Polymyxa betae konukçusu olan özellikle *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae* ve *Portulacaceae* familyalarına ait bitki türlerinin köklerinde endoparazit olarak yaşamını sürdürmektedir. BNYVV'nin konukçusu olan bitkilerin çoğu, *P. betae*'nin de konukçusu durumundadır (Tamada ve Baba, 1973; Abe ve Tamada, 1986; Abe ve Ui, 1986; Barr ve Asher, 1992; 1996; Hugo vd, 1996).

Toprak kökenli bu protozoa, Dünya’da geniş bir alana yayılmış olup, Avrupa (Canova, 1966), Asya (D’ambra ve Mutto, 1977) ve Kuzey Amerika (Falk ve Duffus, 1977)’da saptanmıştır. Payne ve Asher (1990), *P. betae*’nın şeker pancarı yetiştirilen hemen her yerde bulunduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalar ile; *P. betae*’nın, *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) (Ivanoviç, 1983), *Beet soil-borne virus* (BSBV), *Beet virus Q* (BVQ) ve *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV)’ü de naklettiği belirlenmiştir (Meunier vd, 2003; McGrann vd, 2009).

P. betae’nın hayat çemberi hakkında birçok çalışma yapılmış olup yaşam döngüsü genel hatları ile belirlenmiştir (Adams, 1991; Barr ve Asher, 1996; Littlefield ve Whallon, 1999) (Şekil 2. 5). *P. betae*’nin kalın duvarlı, kist (sistosori) adı verilen dinlenme spor kümeleri bulaşık bitki köklerinin çürüyüp parçalanması ile birlikte toprağa karışmaktadır. Bu dinlenme sporları (sistosori), uygun konukçu ve nem olması durumunda toprak içerisinde çimlenerek, primer zoosporları oluşturmaktadır. Primer zoosporlar uygun konukçunun epidermal hücreleri ya da kökleri ile temas ettiklerinde kamçıları absorbe ederek, enkist halini almaktadırlar. Bu şekilde, yaklaşık iki saat sonra konukçu hücrenin içerisine giriş olmaktadır. Hücre içerisinde; primer zoosporun çekirdeği bölünmeye başlamakta ve plasmodium denilen çok çekirdekli yapıyı oluşturmaktadır. Oluşan bu plasmodium’lardan farklı görevlere sahip iki ayrı form gelişebilmektedir. Bunlar; sistosoriyi oluşturacak olan sporogenik plasmodium’lar ya da sekonder zoosporların oluştuğu zoosporangium adı verilen sporangial plasmodium’lardır. *P. betae*’ya ait olan sekonder zoosporlar toprağa her zaman bırakılmamakta, bazı durumlarda hemen zoosporangium’dan komşu hücrelere tutunup o hücrelerin içine giriş yapmaktadırlar (Braselton, 2001). Eğer *P. betae* rhizomania hastalığına neden olan virüsü bünyesinde bulunduruyorsa, konukçu hücre de BNYVV ile bulaşık hale geçmektedir (Whitney ve Duffus, 1995).



Şekil 2.5. *Polymyxa betae*'nin yaşam döngüsü (Keskin, 1964)

P. betae ile taşınan virüslerin, *P. betae*'nin sitoplazması içinde bulunduğu bildirilmiştir (Hébrard vd, 1999). BNYVV ile *P. betae* arasında var olan ilişki ayrıntılı olarak incelenmiş ve virüsün vektörü olan fungus içerisinde uzun süre bulunduğu fakat çoğalmadığı belirtilmiştir (Abe ve Tamada, 1986). BNYVV'nin enfeksiyon oluşturma özelliğini kaybetmeden, *P. betae*'ya ait dinlenme sporlarının içinde en az 15 yıl canlı kalabildiği bildirilmiştir (Abe ve Tamada, 1986; Rush ve Heidel, 1995). BNYVV, toprakta bulunan *P.betae*'ya ait dinlenme sporlarının tamamı tarafından taşınmaz. Yaklaşık olarak % 10-20'si ile taşınmaktadır (McGrann vd, 2009).

P. betae'nin köklerde enfeksiyon oluşturabilmesi için toprak sıcaklığı önemli bir faktördür. *P. betae*'nin köklerde enfeksiyona neden olabilmesi için en uygun toprak sıcaklığının 20-25°C arasında olduğu, fakat toprak sıcaklığının 10°C de olduğu zamanlarda köklerde fungus olmasına rağmen enfeksiyon oluşumunun görülmediği ve 15°C de ise enfeksiyon şiddetinin azaldığı bildirilmiştir (Blunt vd, 1991).

2.7. Hastalığın Kontrolü

Vektör *P. betae*'nin pestisit kullanımı ile kontrolü mümkün olmamaktadır. Bununla birlikte; toprak fümigasyonu ile topraktaki vektör popülasyonunu bir miktar azaltılabilmekte, ancak bu uygulama yüksek ekonomik maliyete ve ciddi çevresel problemlere neden olduğundan, şeker pancarı yetiştiriciliğinde kabul görmemektedir. Vektöre karşı dayanıklılık *Beta patellaris* ve *Beta procumbens*'te belirlenmiş (Paul vd, 1992), ancak ticari şeker pancarı çeşitlerine aktarım başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Üstelik, bu dayanıklılık tamamen *P. betae* enfeksiyonunu önleyememekte, hala virüsün bulaşması mümkün olabilmektedir (Wetzel vd, 2019).

BNYVV'nin vektör *P. betae*'nin kışlama sporlarında toprakta en az 15 yıl canlı kalması (Abe ve Tamada, 1986; Duffus, 1991; Rush ve Heidel, 1995) nedeniyle günümüzde hastalığın en etkili kontrolü dayanıklı çeşitlerin yetiştiriciliğinin yapılması yolu ile olmaktadır (Lewellen, 1995). Bu sebeple, rhizomania'ya karşı ilk dayanıklı çeşit yetiştirme programlarına 1970'lerde başlanmış ve ABD'de 1983'de Holly' dayanıklılığı veya 'Holly' gen Holly Şeker Şirketi üretim programında saptanmış ve kısmi dominant dayanıklılık genini içeren Holly kaynağı *Rz1* olarak adlandırılmıştır (Lewellen vd, 1987). *Rz1* geni kromozom III üzerinde yer almakta olup bu genin virüsün replikasyon ve translokasyonunu azaltarak, BNYVV enfeksiyonuna karşı kısmi dayanıklılık sağladığı belirtilmektedir (Scholten vd, 1994). Hastalığa karşı yüksek dayanıklılık gösteren ilk çeşit, İtalyan gen kaynaklarından 1985 yılında geliştirilen 'Rizor' olmuştur (De Biaggi, 1987) ve 1990'ların başlarına kadar bazı Avrupa ülkelerinde BNYVV ile bulaşık alanlarda bu çeşidin yetiştiriciliği yapılmıştır (Asher, 1993). Günümüzde, halen Dünya'da ve ülkemizde ticari olarak yetiştirilen rhizomania'ya dayanıklı şeker pancarı çeşitlerinin büyük bir kısmı *Rz1* genini içermektedir (Asher, 1993; Wetzel vd, 2019). Daha sonra, Danimarka orjinli yabancı şeker pancarı olan *Beta vulgaris* subsp. *maritima* WB42'de ikinci bir dayanıklılık geni (*Rz2*) daha belirlenmiştir (Scholten vd, 1996; Scholten vd, 1999). Böylece, günümüzde *Rz1* ve *Rz2* genleri BNYVV'ye karşı tek dayanıklılık kaynakları olarak görülmektedir. Daha sonra, *Rz1* ve *Rz2* genlerine ilave olarak, *Rz3*, *Rz4* ve *Rz5* genleri de belirlenmiştir (Grimmer vd, 2007; McGrann vd, 2009). Ancak, bu genler henüz ticari çeşitlere aktarılmamıştır (Wetzel vd, 2019).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Toprak örnekleri

Daha önce yürütülen bir araştırma (TOVAG 110O188 no'lu proje) kapsamında 2010 ve 2011 yıllarında yapılan sürvey çalışmaları ile ülkemizde en yoğun şeker pancarı üretiminin yapıldığı 32 ilden alınan ve BNYVV ile bulaşık olduğu belirlenen 240 toprak örneği içerisinde seçilen 15 ile ait toprak örneği bu çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur. Bu toprak örneklerinin temin edildiği iller (Şekil 3. 1), lokasyonları ve toprak örnek numaraları Çizelge 3. 1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan toprak örneklerinin temin edildiği iller. Kırmızı renkli ve numaralı alanlar örneklerin temin edildiği illeri göstermektedir. 1: Kırklareli, 2: Edirne, 3: Çanakkale, 4: Bursa, 5: Adapazarı, 6: Kütahya, 7: Eskişehir, 8: Kastamonu, 9: Ankara, 10: Samsun, 11: Tokat, 12: Kayseri, 13: Gaziantep, 14: Elazığ, 15: Iğdır

Çizelge 3.1. Tuzak bitki testi çalışmalarında kullanılan toprak örneklerinin temin edildiği il, ilçe, köyler ile toprak örneklerine ait numaralar

Örnek No	İzolat Adı	İl	İlçe	Köy
6	IGDR-6	Iğdır	Aralık	Ortaköy
27	GZNP-27	Gaziantep	İslahiye	Aralık
44	ELZG-44	Elazığ	Merkez	Yedigöze
61	SMSN-61	Samsun	Vezirköprü	Yukarınarlı
106	TKAT-106	Tokat	Niksar	Köseoğlu
125	EDRN-125	Edirne	Merkez	Bosna
134	KRLR-134	Kırklareli	Babaeski	Büyükmandıra
148	BRSA-148	Bursa	Yenişehir	Çardak
150	CNKL-150	Çanakkale	Biga	Sarıkaya
225	ESHR-225	Eskişehir	Çifteler	Merkez
281	KSTM-281	Kastamonu	Taşköprü	Aşağıçayırak
291	ADPZ-291	Adapazarı	Erenler	Merkez
524	KYSR-524	Kayseri	Merkez	Mahzemin
602	KTHY-602	Kütahya	Simav	Gümel
617	ANKR-617	Ankara	Ayaş	Mucar
Toplam: 15				

3.1.2. Şeker Pancarı Tohumları

Bu çalışmada, rhizomania'ya hassas şeker pancarı çeşiti cv. Ansa tohumu kullanılmıştır. Bu çeşidin tohumları Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Şeker Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

3.1.3. Test Bitkileri

BNYVV izolatlarının farklı konukçu bitkilerde reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan mekaniksel inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri Çizelge 3. 2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Biyolojik çalışmalarda kullanılan test bitkileri ve temin edildiği yerler

Latince Adı	Temin Edilen Yer
<i>Beta vulgaris</i> cv. Ansa (rhizomania'ya hassas)	A
<i>Nicotiana benthamiana</i> L.	B
<i>Spinacia oleraceae</i> cv. Rick zwan	C
<i>S.oleraceae</i> cv. Nebraska	C

A: Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Şeker Enstitüsü.

B: USDA/ARS National Center for Genetic Resources Preservation 1111 South Mason St. Fort Collins USA.

C: OMU, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Viroloji Laboratuvarı tohum stokları

3.1.4. Antiserum

Çalışmada BNYVV'ye spesifik poliklonal antiserum kullanılmıştır. BNYVV antiserumu yurt içindeki ticari bir firmadan (Bioreba, İsviçre) temin edilmiştir.

3.1.5. Mikropleytlar

Çalışmada 96 çukurlu polystrene maddeden yapılmış olan ve düztabanlı mikropleytlar (Nunc, Danimarka) kullanılmıştır.

3.1.6. Primerler

İontek firması (İstanbul) tarafından sentezlenen bu çalışmada, BNYVV'nin RNA-2'si tarafından kodlanan kılıf proteini (CP), RNA-3'ü tarafından kodlanan P25 proteini, RNA-4'ü tarafından kodlanan P31 proteini, RNA-5'i tarafından kodlanan P26 proteini bölgelerine ve BNYVV'nin vektörü *P. betae*'ya spesifik ileri (forward) ve geri (reverse) primerler kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3. 3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Moleküler çalışmalarda kullanılan primerler, baz dizileri ve beklenen bant büyüklükleri

Primer	Nükleotid dizilimi	Hedef RNA ve Bölgesi	Beklenen Bant Büyüklüğü (bp)	Literatür
BNYVV/F BNYVV/R	CCATTGAATAGAATTTACCCC CCCCATAGTAATTTAACTC	RNA-2, CP	567	Lennefors vd, 2006
F29 R30	TTAATCCAAGTACCTCGTCT TTGAAATTGTGATAACTCTAA	RNA-3, P25	1.015	Acosta- Leal vd, 2008
RT-4F RT-4R	CAGTCTATCAGTAAGGGGTAG GAGCCCGTTAATACAATTATAC	RNA-4, P31	997	Chiba vd, 2011
Rhizo5F Rhizo5R	GTTTTTCCGCTCGCACAAGCG CGAGCCCGTAAACACCGCATA	RNA-5, P26	885	Schirmer vd, 2005
<i>P. betae</i> / F <i>P. betae</i> / R	GAGGCATGCTTCCGAGGGCTCT CTGCGGAAGGATCATTAGCGTT	<i>P. betae</i>	250	Ward ve Adams, 1998

3.1.7. Tampon Çözeltiler

TBE Buffer; 1 lt saf suya 10.8 g TrisBase, 5.5 g borik asit ve 0.337 g EDTA ilave edilip 121°C’de 20 dakika steril edilerek hazırlanmıştır.

3. 2. YÖNTEM

3.2.1. Tuzak Bitki Testi Yöntemi

Coğrafik orjinlerine göre seçilen 15 toprak örneği tuzak bitki testi çalışmalarında kullanılmıştır (Çizelge 3. 1). Bu topraklar 1: 1 oranında steril kum ile karıştırılmıştır. Daha sonra, bu toprak-kum karışımları plastik saksılara konularak, her birine 10’ar adet BNYVV’ e hassas şeker pancarı (cv. Ansa) tohumları ekilmiştir. Her toprak örneği için 3’er tekerrür uygulanmıştır. Saksılar iklim odasına yerleştirilip 25°C gündüz ve 20°C gece sıcaklığında tutularak, haftada bir kez Hoagland besin solüsyonu (EK 1) ile sulanmıştır. Her bir saksı sekiz haftalık yetiştirme periyodundan sonra hasat edilerek, bitki kökleri musluk suyunda yıkanarak topraktan arındırılmıştır (Şekil 3. 2). Bu bitkilere ait belirtiler ve kök renkleri kayıt edilip fotoğrafları çekildikten sonra, bitkilerin kök bölgeleri alınmış ve ELISA testi, kök boyaması, mekaniksel inokulasyon ve RNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere ayrı ayrı etiketlenerek -80°C’deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü’ne ait iklim odasında yürütülmüştür.



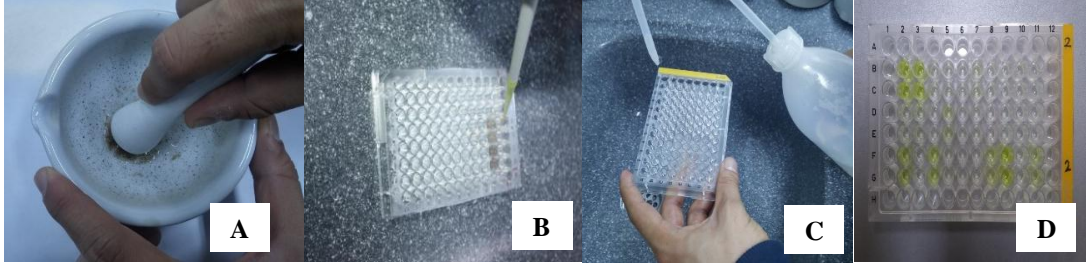
Şekil 3.2. Tuzak bitki testi sonrası şeker pancarı bitkilerinin hasadı

3.2.2. ELISA Testi

Tuzak bitki testi sonucu elde edilen şeker pancarı kök örnekleri ile mekanik inokulasyon çalışmaları sonrasında test bitkilerinden elde edilen yaprak örnekleri Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) testi çalışmalarında kullanılmıştır. DAS-ELISA yöntemi Clark ve Adams (1977) ve antiserumun temin edildiği firmanın açıklamaları göz önüne alınarak gerçekleştirilmiştir.

Bitki örnekleri ekstraksiyon tampon çözeltisinde ezildikten sonra (1g kök / 1gr yaprak: 10 ml örnek tampon çözeltisi) (Şekil 3. 3A), önceden kaplama tampon çözeltisinde (EK 1) 1: 1000 oranında sulandırılarak hazırlanan antiserum ile kaplanmış ELISA mikroplyetlerine 100 µl olacak şekilde ilave edilmiştir (Şekil 3. 3B). Bir gece +4°C'de buzdolabında bekletilmiş olan mikroplyetler, yıkama tampon çözeltisi (EK 1) ile 3 defa yıkandıktan sonra (Şekil 3. 3C), konjugat tampon çözeltisinde (EK 1) 1/1000 oranında sulandırılan konjugat'tan 100 µl mikroplyetin her bir çukuruna ilave edilmiştir. Konjugat inkübasyonu DAS-ELISA yöntemi için 30°C'de 5 saat olarak yapılmıştır.

Konjugat inkübasyon süresi bittikten sonra tekrar yıkama tampon çözeltisi ile mikroplyet çukurları 3 defa yıkandıktan sonra substrat tampon çözeltisi (EK 1) içerisinde 1 mg/ml olacak şekilde hazırlanan substrattan (p-nitrofenil fosfat, Sigma) mikroplyet çukurlarına 100'er µl ilave edilmiştir. Mikroplyetler substrat inkübasyonu için oda sıcaklığında 30-120 dakika inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3. 3D). Sonuçlar ELISA mikroplyet okuyucusunda (Tecan Spectra II) 405 nm dalga boyunda absorbens değerlerinin alınmasıyla elde edilmiştir. Negatif kontrollerin absorbens değerlerinden 2 katı ve daha fazla değer veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Mouhanna vd, 2002).



Şekil 3.3. DAS-ELISA yönteminin uygulanması (A, B, C ve D)

3.2.3. Tuzak Bitki Köklerinde Vektör *Polymyxa betae*'nin Kök Boyaması Yöntemi ile Araştırılması

Tuzak bitki testi sonucunda elde edilen ve bir kısmı ayrılan şeker pancarı kök örnekleri % 0.1 asit fuksin içeren laktogliserin çözeltisi ile muamele edilmiştir. Her köke ait 10 parça alınarak (yaklaşık 1 cm uzunluğunda), alev ile lama fiske edilmiş ve ışık mikroskobu (Leica, İsviçre) altında vektör *P. betae*'nin kışlama spor kümeleri araştırılmıştır (Abe ve Tamada, 1986). Böylece, mikroskopik olarak şeker pancarı köklerinde *P. betae*'nin varlığı saptanmaya çalışılmıştır. Daha sonra, her bir örnekte belirlenen *P. betae*'ya ait dinlenme sporlarının fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.4. Moleküler Çalışmalar

3.2.4.1. RNA İzolasyonu

Türkiye'nin farklı bölgelerini yansıtacak şekilde coğrafik orjinlerine göre seçilen ve tuzak bitki testi yöntemiyle yetiştirilen BNYVV ile enfekteli (15 adet) ve sağlıklı bitkilerin köklerinden ve BNYVV ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinin üst yapraklarından (17 adet) toplam RNA'lar RNeasy RNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) protokolüne göre izole edilmiştir. BNYVV ile enfekteli kök ya da test bitkisi yapraklarından 0.1 g alınmış ve steril havan ve havan eli yardımıyla sıvı nitrojen içerisinde toz haline gelinceye kadar ezilmiştir. Daha sonra bu örneklerin üzerine 600 µl RLT buffer ve 6 µl β-mercaptoethanol ilave edilerek vorteks ile karıştırıldıktan sonra, üzerine leylak rengi kolon yerleştirilen Eppendorf tüplere transfer edilmiştir. Bu karışım 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip, santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant kısım alınarak temiz tüpe aktarılmıştır. Üzerine 260 µl EtOH (% 96-100)

ilave edildikten sonra pembe kolonların bulunduğu Eppendorf tüplerine karışım nakledilmiştir. Tüpler tekrar 30 s 10.000 rpm'de santrifüj edilerek tüpe geçen süpernatant döküldükten sonra, aynı kolona 700 µl RWI buffer ilavesi yapılarak 30 s 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Tekrar tüpe geçen sıvı kısım atılarak pembe kolon yeni Eppendorf tüpe yerleştirilmiş ve kolon üzerine 500 µl RPE buffer ilave edildikten sonra 10.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Süpernatantın tüpten uzaklaştırılmasından sonra, aynı kolon aynı tüpe yerleştirilmiş ve tekrar 500 µl RPE buffer ilave edildikten sonra 10.000 rpm de 2 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Son olarak, bu kolonlar 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerine transfer ettikten sonra, kolon üzerine 30 µl RNase enzimi içermeyen su ilave edilerek tüpler -80°C'deki derin dondurucuda RT-PCR çalışmaları yapılmaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.4.2. Tuzak Bitki Köklerinde Vektör *Polymyxa betae*'nin RT-PCR Yöntemi ile Araştırılması

Tuzak bitki köklerinde BNYVV'nin vektörü *P. betae*'nin araştırılmasında kök boyamasına ilaveten RT-PCR yöntemi de kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3. 3'de verilmiştir. Bu çalışmada tek aşamalı yürütülen RT-PCR çalışmaları, One step RT-PCR kiti (Qiagen) protokolü takip edilerek uygulanmıştır. Bu kit ile gerçekleştirilen amplifikasyonlar 50°C'de 30 dk, 95°C'de 15 dk, 34 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 sn, 55°C'de 30 sn ve 72°C'de 2 dk ve 1 döngü 72°C'de 7 dk ile tamamlanmıştır.

3.2.4.3. BNYVV İzolatlarının P31 Geninin Çoğaltılması

BNYVV' nin vektörle taşınmasında etkin olan, RNA-4 tarafından kodlanan P31 proteinine ait bölgenin çoğaltılmasında tek aşamalı RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3. 3'de verilmiştir. Tek aşamalı RT-PCR, Superscript I One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* DNA Polymerase kiti (Invitrogen) protokolü takip edilerek uygulanmıştır. RT-PCR reaksiyonu; 3 µl total RNA (10 pg-1 µg), 25 µl 2xreaction mix, her bir primerden (10 µM) 1 µl, 0.5 µl MgSO₄ (50 mM) ve 1 µl enzimden (RT/Platinum *Taq* mix) oluşturulmuştur. Toplam reaksiyon hacmi 18.5 µl RNase içermeyen su ile 50 µl'ye tamamlanmıştır. Amplifikasyonlar, Bio-Rad MJ Mini PCR Thermocycler'da, 50°C'de 30 dk, 94°C'de

2 dk, 35 döngü olacak şekilde 94°C’de 15 s, 50°C’de 30 s ve 72°C’de 1 dk ve 1 döngü 72°C’de 7 dk ile tamamlanmıştır.

3.2.4.4. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

PCR sonrası oluşan DNA fragmentlerinin analizi için % 1’lik agaroz jel kullanılmıştır. 0.1 g agaroz (Merck, Almanya) 100 ml’lik 1 X TBE tampon çözeltisi (89 mM Tris, 89 mM Borik asit ve 2 mM EDTA) içerisinde karıştırılarak mikro dalga fırın içerisinde erimesi sağlanmıştır. Karışım ılıdıktan sonra içerisine 5 µl (10mg/ml) ethidium bromür ilave edilerek jel yatay elektroforez tabağına dökülmüştür. Jelin tamamen katılaşması sağlandıktan sonra içerisinde 1 X TBE tampon çözeltisi bulunan elektroforez cihazının tankına yerleştirilmiştir. PCR tüpleri içerisindeki RNA örneklerinden 10 µl alınarak 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki hücelere yerleştirilmiştir. İlk hücreye bantların moleküler büyüklüğünü belirlemek için 7 µl markör (1Kb DNA Ladder) konulduktan sonra, diğer hücelere örnekler yerleştirilerek 90 mA sürekli akımda 1 saat süre ile elektroforeze tabi tutulmuştur. Jeldeki PCR fragmentlerinin analizi ise GelDoc 2000 (Biorad, ABD) görüntüleme sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve jelde oluşan bantların fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.4.5. BNYVV İzolatlarının P31 Protein Bölgelerinin Nükleotit Dizilerinin Elde Edilmesi

Çoğaltımı sağlanan toplam 10 BNYVV izolatına ait (IGDR-6, GZNP-27, ELZG-44, SMSN-61, EDRN-125, BRSA-148, CNKL-150, KSTM-281, KYSR-524 ve ANKR-617) PCR ürünlerinden 40’ar µl, önerilen konsantrasyonda (5 pmol) hazırlanan P31 genine özgü primerler ile birlikte sekans hizmeti veren firmalara (BM Laboratuvar Sistemleri ve Genoks) gönderilmiştir. BNYVV izolatlarının Sanger Dizileme Yöntemine göre, ileri ve geri yönlü PCR primerleri kullanılarak elde edilen ham sekans verileri Codon Code Aligner ve/ya da MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programında (Kumar vd, 2016) Clustal W (Thompson vd, 1994) yöntemi kullanılarak hizalanmıştır. Daha sonra, her iki yöndeki okumaya ait sekans verilerinin konsensus dizileri elde edilmiştir.

3.2.4.6. BNYVV İzolatlarının P31 Genine Göre Moleküler Karakterizasyonu

BNYVV izolatlarının P31 gen bölgesini içeren her iki yöndeki okumaya ait sekans verilerinin konsensus dizileri elde edildikten sonra, hem nükleotit, hem de aa dizileri bakımından NCBI (National Centre for Biotechnology Information-GenBank)'daki diğer izolatlar ile kıyaslanmıştır. İzolatların hem kendi aralarındaki, hem de Dünya'daki diğer izolatlar ile genetik benzerlik veya farklılıkları, BLAST analizi ile ortaya konulmuştur.

Ayrıca, P31 genine göre; Mega 7 yazılımında (Kumar vd, 2016) yer alan Tamura-Nei Modeli (Tamura ve Nei, 1993) kullanılarak izolatların genetik uzaklıkları belirlenmiş ve Maximum Likelihood (ML) algoritmasına göre (Felsenstein, 1981) filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değeri olarak 1000 alınmıştır.

3.2.5. Biyolojik Çalışmalar

Biyolojik çalışmalarda kullanılmak üzere; BNYVV'nin sistemik konukçuları olan *N. benthamiana*, *S. oleraceae* (cv. Rick Zwan ve cv. Nebraska) ve *Beta vulgaris* (cv. Ansa-BNYVV'ye hassas) bitkileri seçilmiştir (Çizelge 3. 2) (Gilmer, 2017). Bununla birlikte, bu çalışmada, *N. benthamiana* bitkisi üzerinde çalışmalar yoğun olarak yürütülmüştür. Nitekim *N. benthamiana* bitkisi, farklı bitki-patojen interaksiyon çalışmalarında gen ifadesinin kıyaslanması ve bitki-patojen interaksiyonlarının irdelenmesi amacıyla model bitki olarak kullanılmaktadır (Goodin vd, 2008; Satoh vd, 2010). Böylelikle; farklı lokasyonlardan seçilen 15 BNYVV izolatının *N. benthamiana* bitkisinde meydana getirdiği reaksiyonlara göre izolatlar arasında biyolojik olarak herhangi bir farklılığın olup olmadığının incelenmesinin yanı sıra, bu bitkide oluşan enfeksiyon anında BNYVV'nin patojenitesinde rol oynayan diğer bazı önemli proteinlerine (CP, P25, P31 ve P26) ait genlerin de detaylı olarak irdelenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla, öncelikle test bitkilerinin tohumları torf içeren plastik kaplara ekilmiştir (Şekil 3. 4). Bitkiler uygun inokulasyon dönemine geldiğinde, torf dolu plastik bardaklara şaşırtılarak (Şekil 3. 5), 25°C'de iklim odasında inkübe edilmiştir.

Fungal hastalık ve böcek zararlarından korumak için bitkiler rutin olarak kontrol edilmiş, zaman zaman yaprak biti ve beyazsineklere karşı ilaçlama yapılmıştır.

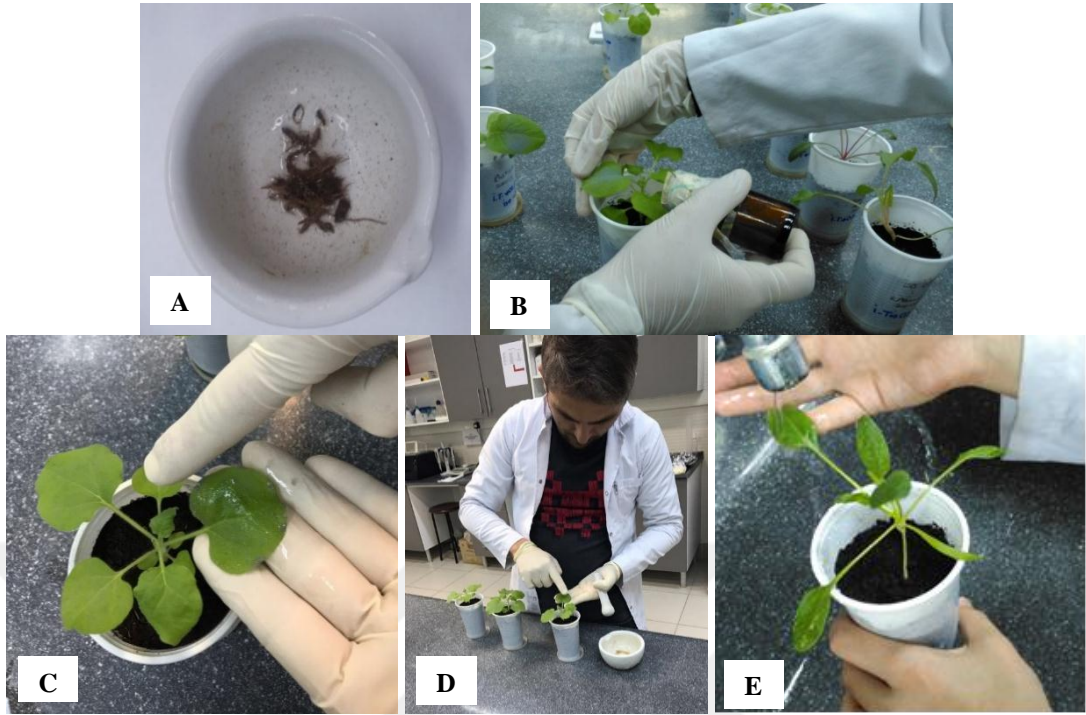


Şekil 3.4. Plastik kaplarda yetiştirilen bitkilerinin görünümüleri



Şekil 3.5. Plastik bardaklara şaşırtılan bitkilerinin genel görünümüleri

Tuzak bitki testi sonucu 15 farklı BNYVV izolatlarından elde edilen BNYVV'ye hassas şeker pancarları (cv. Anşa) kök örnekleri ile Onbeş BNYVV izolatının mekaniksel inokulasyon yöntemi ile *N. benthamiana* bitkilerine ilk aktarımından 30 gün sonra oluşan inokulesiz üst yaprakları biyolojik çalışmalarda kullanılmıştır. Bu amaçla bu enfekteli bitkilerden alınan, 1g kök / 1gr yaprak: 5 ml tampon çözelti olacak şekilde steril havanda homojenize edilmiştir (Şekil 3. 6A). Tampon çözelti olarak % 1 oranında 2-mercapto ethanol içeren 0.1 M fosfat tampon çözeltisi (pH: 7.0) kullanılmıştır (Tamada ve Baba, 1973; Liu vd, 2005). Elde edilen bitki özsuvarı, 400 mesh'lik karbarandum tozu ile tozlanmış (Şekil 3. 6B) ve Çizelge 3. 2'de belirtilen test bitkilerinin yapraklarına *N. benthamiana*'da üç tekerrürlü, ıspanak ve şeker pancarlarında ise bir tekerrür olacak şekilde inokule edilmiştir (Şekil 3. 6C-D). İnokulasyon sonrası, karbarandum tozu ve bitki artıklarının arındırılması için bitkiler çeşme suyu altında dikkatlice yıkanmıştır (Şekil 3. 6E).



Şekil 3.6. Mekaniksel inokulasyon yönteminin uygulanması (A, B, C, D ve E)

Ayrıca, her bir uygulama için 1 adet kontrol bitki ayrılmış ve bu bitkiler sadece tampon çözelti ile inokule edilmiştir. Daha sonra, bu bitkiler iklim odasına alınarak, 20-25°C'de 4 hafta süre ile periyodik olarak izlenip, belirtiler kayıtları yapılmış ve fotoğrafları çekilmiştir. Takiben, belirtiler gösteren ve göstermeyen test bitkilerinin virüs ile inokule edilen ve inokule edilmeyen yaprak örneklerinin bir kısmı alınarak DAS-ELISA yöntemi ile Yöntem 3.2.2'de açıklandığı gibi test edilmiştir. Bu örneklerin kalan kısımları ise, toplam RNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere etiketlenerek -80°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.5.1. *N. benthamiana* Bitkilerinde Yürütülen Moleküler Çalışmalar

Tez çalışmasının proje metninde yer almamasına rağmen, *N. benthamiana* bitkilerinin virüs inokulasyonu yapılmayan üst yapraklarından örnekleme yapılmış ve RNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır. Maliyetinin yüksek olmasından dolayı, RNA izolasyonu çalışmaları 15 BNYVV izolatına ait uygulanan tekrürlerin tamamında gerçekleştirilememiş, ancak her bir izolata ait birer tekrür seçilerek bu çalışmalar yürütülmüştür. İzolata ait tekrürün seçiminde, ELISA absorbans değeri (en yüksek

absorbans değeri) ile bitkide oluşan belirtiler göz önüne alınmıştır. Sadece, GZNP-27 izolatında, ELISA değeri pozitif olan 2. tekrürün yanısıra, ELISA değeri negatif olan 3. Tekrür de RNA izolasyonu çalışmasına dahil edilmiştir (Çizelge 3. 4). Sağlıklı ve BNYVV ile enfekteli *N. benthamiana* bitkilerinin yapraklarından, toplam 17 örnekte toplam RNA'lar RNeasy RNA izolasyon kiti protokolüne göre Yöntem 3.2.4.1.'de belirtildiği şekilde izole edilmiştir.

Çizelge 3.4. Mekanik olarak BNYVV ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinden moleküler çalışmalar için seçilen BNYVV izolatlarına ait veriler

İzolat Adı	Seçilen Tekrür	ELISA Absorbans Değeri	Makroskobik Gözlem Sonuçları*
IGDR-6	3.	0.166 (-)	YK, M, NL
GZNP-27	2.	0.386 (+)	YK, M, C
	3.	0.129 (-)	YK, M
ELZG-44	1.	0.111 (-)	YK, M, NL
SMSN-61	2.	0.097 (-)	YK, M, NL
TKAT-106	2.	0.104 (-)	YK, M, NL
EDRN-125	2.	0.105 (-)	YK, M, NL
KRLR-134	1.	0.150 (-)	YK, M
BRSA-148	2.	0.099 (-)	YK, M, NL, HC
CNKL-150	3.	0.137 (-)	YK, M, NL, C
ESHR-225	1.	0.119 (-)	YK, M, NL
KSTM-281	2.	0.103 (-)	YK, M, NL
ADPZ-291	3.	0.114 (-)	YK, M, NL
KYSR-524	1.	0.105 (-)	YK, M, NL, C
KTHY-602	3.	0.107 (-)	YK, M, NL
ANKR-617	3.	0.124 (-)	YK, M, C

* HC: Hafif cüceleşme, C: Cüceleşme, M: Mozaik, NL: Nekrotik leke, YK: Yapraklarda kıvrılma

Daha sonra, *N. benthamiana*'nın üst yapraklarında farklı BNYVV izolatlarının enfeksiyon esnasında oluşturdukları; virüsün patojenitesi ve semptom oluşumunda rol oynayan bazı önemli proteinlerine (CP, P25, P31 ve P26) ait gen bölgeleri RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

3.2.5.1.1. Kılıf Protein Bölgesinin RT-PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

BNYVV izolatlarının RNA-2 tarafından kodlanan kılıf protein (CP) bölgesinin çoğaltılmasında uygulanan RT-PCR çalışmalarında Lennefors vd (2006)'nin belirttikleri BNYVV/F (GAAGAAGATAGTACCAACATG) ve BNYVV/R (CCGAGCAGCTAATTGCTA) primerler kullanılmıştır (Çizelge 3. 3).

Öncelikle, 16 örnekte Omniscript Reverse Transcription kit (Qiagen) ile cDNA sentezi, kit protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. İlk olarak steril santrifuj tüpüne 2 µl RNA ilave edilerek 65°C’de 5 dk su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tüpler buz içerisinde kısa bir süre bekletilmiştir. Takiben, RNA üzerine, 2 µl 10XBuffer RT, 2 µl 5 mM dNTP, 2 µl 10 mM reverse primer (BNYVV/R), 1 µl RNase inhibitör (10 U/µl), 1 µl Omniscript RT Enzimi ve 10 µl RNase-free su ilave edilerek karışımları sağlanmış ve sonrasında 37°C’de 1 saat ısıtıcı blokta inkübasyona bırakılmıştır.

PCR reaksiyonu; 10 µl 5xGC Buffer, 1 µl 10 mM dNTP mix, her bir primerden (10 µM) 2.5 µl, 1.5 µl DMSO, 2.5 µl cDNA ve 0.5 µl enzimden (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase) oluşmuştur. Toplam reaksiyon hacmi 19.5 µl RNase içermeyen su ile 40 µl’ye tamamlanmıştır. Amplifikasyonlar thermocycler’de, 25 döngü olacak şekilde 98°C’de 30 s başlangıç denatürasyon basamağından sonra, 98°C’de 10 s, 54.2°C’de 30 s, 72°C’de 30 s ve 1 döngü 72°C’de 5 dk şeklinde uygulanmıştır.

3.2.5.1.2. P25 Protein Bölgesinin RT-PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

BNYVV’ nin patojenitesinde etkin olan ve RNA-3 tarafından kodlanan P25 proteinine ait bölgenin çoğaltılmasında RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada Acosta-Leal vd (2008)’nin belirttikleri F29 ve R30 primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3. 3). Tek aşamalı olarak yürütülen RT-PCR çalışmaları, Superscript I One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* DNA Polymerase kiti (Invitrogen) protokolü takip edilerek uygulanmıştır.

Bu kit ile yapılan optimizasyonlar sonucunda; PCR tampon çözeltisindeki MgSO₄ konsantrasyonuna (2.4 mM) 0.5 mM daha MgSO₄ ilavesi ile daha iyi ürün elde edilebilmiştir. RT-PCR reaksiyonu; 3 µ total RNA (10 pg-1 µg), 25 µl 2xreaction mix, her bir primerden (10 µM) 1 µl, 0.5 µl MgSO₄ (50 mM) ve 1 µl enzimden (RT/Platinum *Taq* mix) oluşturulmuştur. Toplam reaksiyon hacmi 18.5 µl RNase içermeyen su ile 50 µl’ye tamamlanmıştır. Kitin içerisinde bulunan 2Xreaction mix; 0.4 mM dNTP mix ile 2.4 mM MgSO₄ içermektedir. Reaksiyon, 50°C’de 30 dk, 94°C’de 2 dk, 35 döngü olacak şekilde 94°C’de 15 s, 50°C’de 30 s ve 72°C’de 1 dk ve 1 döngü 72°C’de 7 dk ile tamamlanmıştır.

3.2.5.1.3. P26 Protein Bölgesinin RT-PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

BNYVV'nin patojenitesinde etkin olan RNA-5 tarafından kodlanan P26 protein genine ait bölgenin araştırılmasında RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler Rhizo5F (GTTTTTCCGCTCGCACAAGCG) ve Rhizo5R (CGAGCCCGTAAACACCGCATA) (Schirmer vd, 2005)'dir (Çizelge 3. 3). Yedi örnekte gerçekleştirilen tek aşamalı RT-PCR, Superscript III One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* DNA Polymerase kiti (Invitrogen) protokolleri takip edilerek uygulanmıştır. Reaksiyon 12.5 µl 2X Reaksiyon karışımı, her bir primerden (10 µM) 0.5 µl (son konsantrasyon: 0.2 µM), 1 µl Superscript III RT/Platinum *Taq* Mix ve 1 µl RNA'dan oluşturulmuştur. Toplam reaksiyon hacmi RNase ve DNase içermeyen su ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon, Bio-Rad MJ Mini PCR Thermocycler' da, 55°C'de 30 dk, 94°C'de 2 dk, 40 döngü olacak şekilde 94°C'de 15 s, 59°C'de 30 s ve 68°C'de 1 dk ve 1 döngü 68°C'de 5 dk ile tamamlanmıştır.

3.2.5.1.4. P31 Protein Bölgesinin RT-PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

BNYVV'nin vektörle taşınmasında etkin olan, RNA-4 tarafından kodlanan P31 proteinine ait bölgenin çoğaltılmasında tek aşamalı RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3. 3'de verilmiştir. Tek aşamalı RT-PCR, Superscript I One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* DNA Polymerase kiti (Invitrogen) protokolü takip edilerek Yöntem 3.2.4.3'de açıklandığı şekilde uygulanmıştır.

3.2.5.1.5. *N. benthamiana* Bitkilerinden Elde Edilen BNYVV İzolatlarının P31 Genine Ait Bölgenin Nükleotit Dizilerinin Elde Edilmesi

N. benthamiana bitkilerinin üst yapraklarından elde edilen beş BNYVV izolatının (ELZG-44-1, BRSA-148-2, CNKL-150-3, KYSR-524-1 ve ANKR-617-3) P31 proteinine ait PCR ürünlerinin sekans analizleri Genoks (Ankara) firması tarafından yapılmıştır. Sekans analizi sonrasında 'Codon Code Aligner' programı kullanılarak BNYVV izolatlarının RNA-4' üne ait ileri ve geri yönde elde edilen ham sekans verileri hizalanmış ve konsensus diziler elde edilmiştir. Daha sonra BNYVVV

izolatlarına ait bu konsensus diziler, tuzak bitkiden elde edilen BNYVV izolatlarına ait P31 sekans verileri ile BLAST yapılarak analiz edilmiştir.

3.2.5.2. *N. benthamiana*'dan elde edilen BNYVV İzolatlarının *N. benthamiana* Bitkilerine İkinci Aktarımı

Onbeş BNYVV izolatının mekaniksel inokulasyon yöntemi ile *N. benthamiana* bitkilerine ilk aktarımını takiben 30 gün sonra, bu bitkilerin üst yapraklarının bir kısmı ayrılarak, ayrı ayrı etiketlenip -80°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Daha sonra, bu örnekler virüs inokulumu olarak kullanılarak, 2. kez *N. benthamiana* bitkilerine Yöntem 3.2.5'da belirtildiği şekilde virüs aktarımı gerçekleştirilmiştir. İnokulasyonu takiben 1 ay sonra, virüs inokuleli ve üst yapraklar alınmış, Yöntem 3.2.2'de belirtildiği şekilde ELISA ile test edilmiştir. Ayrıca, her iki inokulasyon sonucunda *N. benthamiana* bitkilerinde oluşan belirtiler göz önüne alınarak, üç örnek seçilmiştir. Bu örneklerde RNA izolasyonunu takiben, Yöntem 3.2.4.3'de belirtildiği şekilde P31 genine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR çalışması gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Tuzak Bitki Testi ve ELISA Testi Sonuçları

Coğrafik orjinlerine göre seçilen 15 farklı toprak örneğinde, BNYVV'e hassas şeker pancarı çeşiti (cv.) Anşa tuzak bitki testi yöntemine göre sekiz hafta süre ile yetiştirilmiştir (Şekil 4. 1). Hasat öncesi, her bir saksıdaki bitkilere ait makroskobik gözlemler kaydedilmiş ve farklı tarzda simptom sergileyen örneklerin fotoğrafları çekilmiştir. Daha sonra bu bitkilerin kökleri hasat edildikten sonra Yöntem 3. 2. 2'de belirtildiği şekilde ELISA ile test edilmiştir.



Şekil 4.1. İklim odasında tuzak bitli testi yöntemine göre yetiştirilen bitkilerin genel görünümü

İncelenen örneklere ait ortalama kök ve bitki ağırlıkları, kök rengi ile makroskobik gözlemlere ait bilgiler ve ortalama ELISA absorban değerleri Çizelge 4. 1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Coğrafik orjinlerine göre seçilen toprak örneklerinde BNYVV'nin bulunma durumu ve bu bölgelere ait toprak örneklerinde tuzak bitki testi yöntemi ile yetiştirilen bitkilere ait bilgiler

İl	İzolot No	Ort. Ağırlık (g)		Kök Rengi*	Makroskopik Gözlem**	Ortalama ELISA Absorbans Değeri***
		Bitki	Kök			
Iğdır	6	1.300	0.077	A. K	N	0.241 (+)
Gaziantep	27	0.650	0.030	A. K	N	0.361 (+)
Elazığ	44	0.857	0.091	A. K	N	2.926 (+)
Samsun	61	1.323	0.101	A. K	N	2.743 (+)
Tokat	106	0.938	0.044	A. K	N	0.544 (+)
Edirne	125	0.917	0.055	A. K	YK	3.507 (+)
Kırklareli	134	0.815	0.052	A. K	C	3.326 (+)
Bursa	148	0.670	0.048	A. K	N	3.363 (+)
Çanakkale	150	0.606	0.054	A. K	C, K	2.669 (+)
Eskişehir	225	1.170	0.098	A. K	N	2.360 (+)
Kastamonu	281	0.673	0.043	A. K	N	2.757 (+)
Adapazarı	291	0.984	0.080	A. K	YFB	0.361 (+)
Kayseri	524	0.963	0.053	A. K	N	3.193 (+)
Kütahya	602	0.522	0.032	A. K	C	3.354 (+)
Ankara	617	0.732	0.050	A. K	N	3.508 (+)
Sağlıklı Kontrol	NK	1.412	0.196	A. K		0.102 (-)

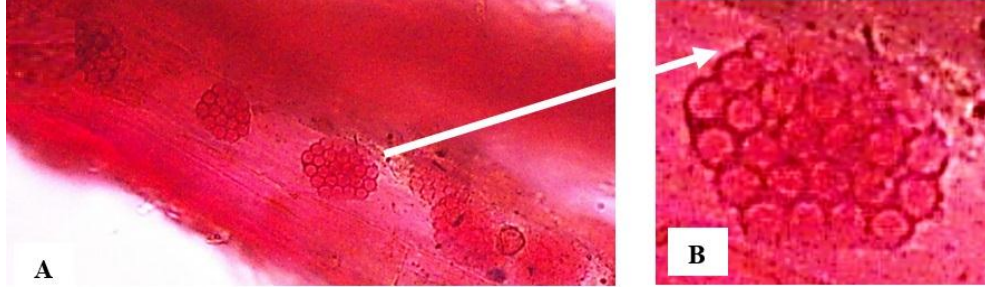
*: A. K: Açık Kahverengi

** : N: Normal Bitki Gelişimi, C: Cüceleşme, NK: Negatif Kontrol, YFB: Yaprakta Form Bozukluğu, YK: Yapraklarda Kıvrılma, K: Kloroz

***: Tuzak bitki testi sonrasında uygulanan ELISA testinde 2 h'lik substrat inkubasyonu sonucu elde edilen ELISA değeri ortalamaları; + = Bioraba negatif kontrolün 2 katından fazla olan ELISA absorbans değerlerini ifade etmektedir.

4.2. Kök Boyaması Yöntemine Göre Tuzak Bitki Köklerinde Vektör *Polymyxa betae*'nin Belirlenmesi

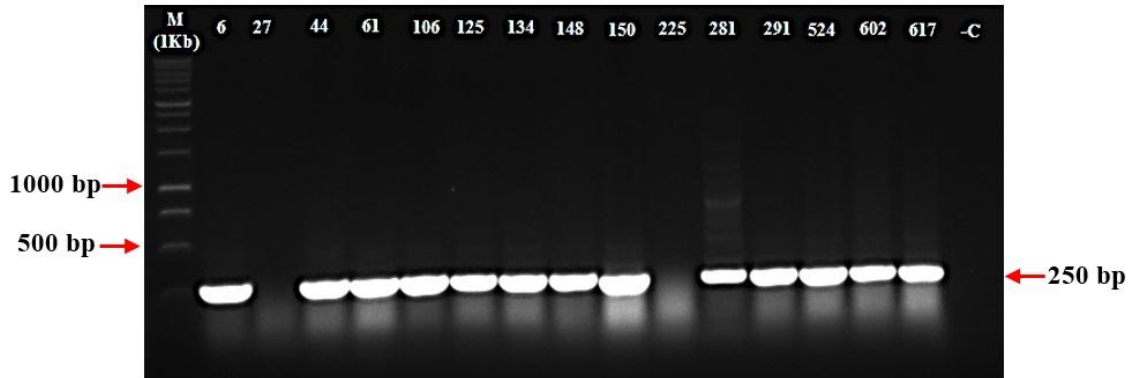
Bu çalışmada Yöntem 3.2.3' de belirtildiği gibi ışık mikroskobu altında, BNYVV ile enfekteli şeker pancarı bitkilerinin kılcal köklerinde *P. betae*'nin dinlenme spor yapıları (sistosori) araştırılmıştır. İncelenen örneklere ait köklerin tamamında bal peteği şeklinde sistosorilerin bir araya gelmesinden oluşan dinlenme spor yapılarının varlığı belirlenmiştir (Şekil 4. 2).



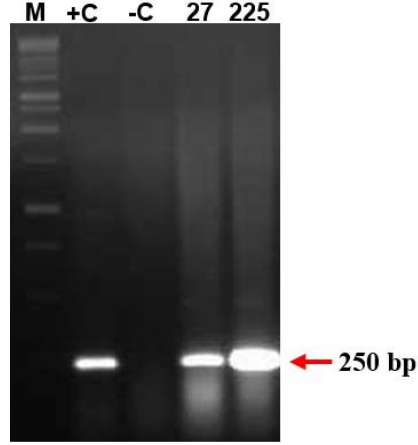
Şekil 4.2. Tuzak bitki testi yöntemine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinin kılcal köklerinde belirlenen *Polymyxa betae*'ya ait dinlenme spor yapılarının görünümü (A ve B)

4.3. RT-PCR Yöntemi ile Tuzak Bitki Köklerinde Vektör *Polymyxa betae*'nin Belirlenmesi

Bu çalışmada, şeker pancarı bitkisinin köklerinde vektör *P. betae*'nin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, *P. betae*'ya spesifik primerler kullanılarak tek aşamalı olarak yürütülen RT-PCR çalışması ile elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüleme cihazında incelenmesi sonucunda; incelenen 15 örneğin tamamında bu bölgeye spesifik 250 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir (Şekil 4. 3 ve Şekil 4. 4).



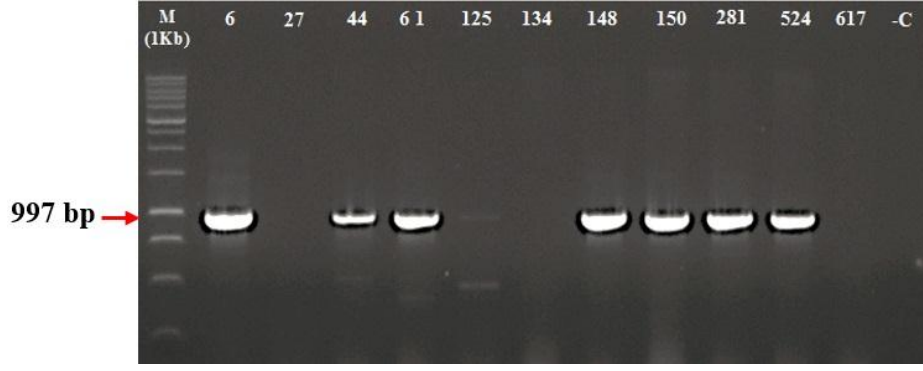
Şekil 4.3. Şeker pancarı köklerinden izole edilen toplam RNA'lar kullanılarak *P. betae*'nin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), -C: Enfekteli olmayan şeker pancarı köklerinden elde edilen RNA'lar, 6: Aralık-Iğdır, 27: İslahiye-Gaziantep, 44: Merkez-Elazığ, 61: Vezirköprü-Samsun, 106: Niksar-Tokat, 125: Merkez-Edirne, 134: Babaeski-Kırklareli, 148: Yenişehir-Bursa, 150: Biga-Çanakkale, 225: Çifteler-Eskişehir, 281: Taşköprü-Kastamonu, 291: Erenler-Adapazarı, 524: Merkez-Kayseri, 602: Simav-Kütahya, 617: Ayaş-Ankara illerine ait şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneklerinden elde edilen RNA'lar]



Şekil 4.4. *P. betae*'nin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), +C: 6 no (Aralık-Iğdır)'lu örneğe ait RNA, -C: sağlıklı şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneğinden elde edilen RNA, 27: İslahiye-Gaziantep, 225: Çifteler-Eskişehir]

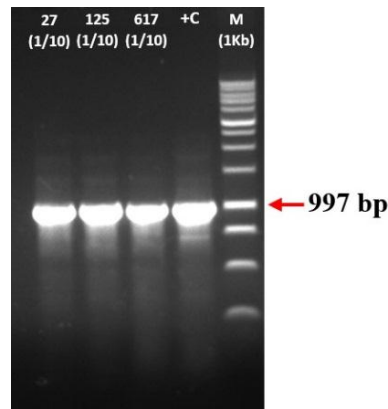
4.4. BNYVV İzolatlarında P31 Genini İçeren Bölgenin çoğaltılması

Tez çalışmasının bu kısmında Yöntem 3.2.4.3'de belirtildiği şekilde; BNYVV'nin vektörle etkili bir şekilde taşınmasında rol oynayan ve RNA-4 üzerinde yer alan P31 protein genine spesifik primerler (Chiba vd, 2011) kullanılarak, cv. Ansa'nın köklerinden izole edilen 15 BNYVV izolatu RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. PCR ürünlerinin jel görüntüleme cihazında incelenmesi sonucunda cv. Ansa'ya ait örneklerinin 7'sinde bu bölgeye spesifik 997 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir (Şekil 4. 5). Bu örnekler; Iğdır, Elazığ, Samsun, Bursa, Çanakkale, Kastamonu ve Kayseri illeri şeker pancarı üretim alanlarından elde edilmiştir.



Şekil 4.5. P31 geninin RT-PCR yöntemi ile çoğaltılması [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), -C: sağlıklı şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneğinden elde edilen RNA, 6: Aralık-Iğdır, 27: İslahiye-Gaziantep, 44: Merkez-Elazığ, 61: Vezirköprü-Samsun, 125: Merkez-Edirne, 134: Babaeski-Kırklareli, 148: Yenişehir-Bursa, 150: Biga-Çanakkale, 281: Taşköprü-Kastamonu, 524: Merkez-Kayseri, 617: Ayaş-Ankara illerine ait şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneklerinden elde edilen RNA'lar]

P31 proteinine spesifik ürün edilemeyen ya da multiple bant oluşumu gözlenen örneklerde RT-PCR çalışmalarında optimizasyona gidilerek, RNA konsantrasyonu 1/10 oranında düşürülmüş ve çalışmalar tekrar edilmiştir. Bunun sonucunda; 27 (Iğdır), 125 (Edirne) ve 617 (Ankara) no'lu örneklerde beklenen büyüklükte ürün elde edilebilmiştir (Şekil 4. 6). Ancak, Tokat, Kırklareli, Adapazı, Eskişehir ve Kütahya illerine ait 5 örnekte (106, 134, 291, 225 ve 602 no'lu) 997 bp büyüklüğünde bant oluşumu gözlenmemiştir. Sonuç olarak; incelenen cv. Ansa örneklerinin toplam 10'unda P31 geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.6. P31 geninin RT-PCR yöntemi ile amplifikasyonu [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), +C: 6 no (Aralık-Iğdır)'lu örneğe ait RNA, 27: İslahiye-Gaziantep, 125: Merkez-Edirne, 617: Ayaş-Ankara illerine ait şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneklerinden elde edilen RNA'lar.]

4.5. BNYVV İzolatlarının P31 Proteininin Baz ve Amino Asit Dizisi Analiz

Sonuçları

Tuzak bitki testi yöntemi ile yetiştirilen Ansa köklerinden elde edilen toplam 10 BNYVV izolatının P31 proteinine ait PCR ürünlerinin sekans analizleri Genoks (Ankara) ve BM (Ankara) firmaları tarafından yapılmıştır. Sekans analizi sonrasında 'Codon Code Aligner' programı kullanılarak BNYVV izolatlarının RNA-4'üne ait illeri ve geri yönde elde edilen ham sekans verileri hizalanmış ve konsensus diziler elde edilmiştir. Bu konsensus nükleotit dizilerinden izolatlara ait amino asit dizileri elde edilmiştir (EK 4).

BNYVV izolatlarının RNA-4'ünün sekans analizi yapılan bölgenin uzunluğu yaklaşık 849 baz kadar olup P31 geninin tamamını içermektedir (EK-3). İzolatların kendi aralarındaki genetik benzerliklerin incelenmesi amacıyla NCBI'daki BLASTn algoritması kullanılmıştır. Bu çalışmada; Iğdır (IGDR-6), Gaziantep (GZNP-27), Elazığ (ELZG-44), Samsun (SMSN-61), Edirne (EDRN-125), Bursa (BRSA-148), Kayseri (KYSR-524), Çanakkale (CNKL-150), Kastamonu (KSTM-281) ve Ankara (ANKR-617) illeri şeker pancarı üretim alanlarından elde edilen, toplam 10 BNYVV izolatının P31 bölgesine ait baz dizileri irdelenmiştir. Buna göre; SMSN-61, EDRN-125, BRSA-148 ve KYSR-524 izolatlarının P31 genine göre nükleotit düzeyinde % 100 benzer oldukları belirlenmiştir. Diğer izolatların ise nükleotit düzeyinde birbirleriyle yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (% 97.88-% 99.88) (Çizelge 4. 2).

Çizelge 4.2. BNYVV izolatlarına ai P31 proteininin nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)

İzolat Adı	Orjin	No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IGDR-6	Iğdır	1	*	97.88	98.12	98	98	98	97.88	97.88	98	97.88
GZNP-27	Gaziantep	2	97.88	*	99.76	99.88	99.88	99.88	99.76	99.76	99.88	99.76
ELZG-44	Elazığ	3	98.12	99.76	*	99.88	99.88	99.88	99.76	99.76	99.88	99.76
SMSN-61	Samsun	4	98	99.88	99.88	*	100	100	99.88	99.88	100	99.88
EDRN-125	Edirne	5	98	99.88	99.88	100	*	100	99.88	99.88	100	99.88
BRSA-148	Bursa	6	98	99.88	99.88	100	100	*	99.88	99.88	100	99.88
CNKL-150	Çanakkale	7	97.88	99.76	99.76	99.88	99.88	99.88	*	99.76	99.88	99.76
KSTM-281	Kastamonu	8	97.88	99.76	99.76	99.88	99.88	99.88	99.76	*	99.88	99.76
KYSR-524	Kayseri	9	98	99.88	99.88	100	100	100	99.88	99.88	*	99.88
ANKR-617	Ankara	10	97.88	99.76	99.76	99.88	99.88	99.88	99.76	99.76	99.88	*

Farklı coğrafik bölgelerden elde edilen 10 BNYVV izolatının P31 gen bölgesinde farklılık belirlenen nükleotit pozisyonları Çizelge 4. 3’de gösterilmiştir. Çizelge 4. 3. incelendiğinde, IGDR-6 izolatının diğer izolatlardan oldukça fazla sayıda (17 adet) pozisyonda nükleotit düzeyinde diğer izolatlardan farklılık sergilediği dikkat çekmiştir (Çizelge 4. 3).

Çizelge 4.3. BNYVV izolatlarının P31 gen bölgesinde farklılık belirlenen nükleotit pozisyonları

İzolat Adı	Nükleotit Pozisyon Numarası																			
	1	1	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	6	7	7	7	
	4	3	6	1	4	0	1	7	7	1	2	3	5	1	6	9	2	0	1	1
	1	5	7	4	3	3	3	6	8	9	7	8	9	0	7	2	0	2	0	7
IGDR-6	C	T	T	C	T	C	A	T	G	C	G	T	A	G	T	T	T	A	T	
GZNP-27	T	C	C	T	C	T	G	C	A	C	A	C	G	A	T	A	C	C	A	C
ELZG-44	T	C	C	T	C	T	G	C	A	C	A	C	G	A	T	T	C	C	A	C
SMSN-61	T	C	C	T	C	T	G	C	A	C	A	C	G	A	T	A	C	C	A	C
EDRN-125	T	C	C	T	C	T	G	C	A	C	A	C	G	A	T	A	C	C	A	C
BRSA-148	T	C	C	T	C	T	G	C	A	C	A	C	G	A	T	A	C	C	A	C
CNKL-150	T	C	C	T	C	T	G	C	A	C	A	C	G	A	T	A	C	C	T	C
KSTM-281	T	C	C	T	C	T	G	C	A	C	A	C	G	A	C	A	C	C	A	C
KYSR-524	T	C	C	T	C	T	G	C	A	C	A	C	G	A	T	A	C	C	A	C
ANKR-617	T	C	C	T	C	T	G	C	A	T	A	C	G	A	T	A	C	C	A	C

P31 genom bölgesi için bu çalışmada incelenen BNYVV izolatlarının Dünya izolatları ile BLASTn analizi ile nükleotit düzeyinde karşılaştırılması sonucu Türkiye’den elde edilen izolatlar iki gruba ayrılmıştır. İlk grupta yer alan IGDR-6 izolatı Kazakistan’a ait Kas2 ve Kas3 izolatlarıyla % 99.76 oran ile en yüksek benzerliğe sahip olmuştur. İkinci grupta yer alan diğer BNYVV izolatları ise, en yüksek genetik benzerliği İtalya’ya ait IV4 ve I12 izolatları ile göstermiştir (Çizelge 4. 4.). Üstelik, bu grup içerisindeki, SMSN-61, EDRN-125, BRSA-148 ve KYSR-524 izolatlarının İtalya şeker pancarı üretim alanlarından izole edilen IV4 ve I12 izolatları ile % 100 benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların en yüksek ikinci benzerlik oranına (% 99.88) sahip olduğu izolat ise, Brazilya’ya ait Brazilian izolatı olmuştur (Çizelge 4. 4).

Çizelge 4.4. BNYVV izolatlarının dizi analizi yapılan P31 geninin nükleotid düzeyinde Dünya izolatları ile benzerlik oranları*

İzolat Adı	NCBI İzolat Adı	NCBI Kayıt No	Benzerlik Oranı (%)	Orjini
IGDR-6	Kas2	AF197554	99.76	Kazakistan
	Kas3	AF197557	99.76	Kazakistan
	IR-GR	AM779754	99.53	İran
GZNP-27	IV4	AB563124	99.88	İtalya
	I12	AF197552	99.88	İtalya
	Brazilian	MH106729	99.76	Brezilya
ELZG-44	IV4	AB563124	99.88	İtalya
	I12	AF197552	99.88	İtalya
	Brazilian	MH106729	99.76	Brezilya
SMSN-61, EDRN-125, BRSA-148, KYSR-524	IV4	AB563124	100	İtalya
	I12	AF197552	100	İtalya
	Brazilian	MH106729	99.88	Brezilya
CNKL-150	IV4	AB563124	99.88	İtalya
	I12	AF197552	99.88	İtalya
	Brazilian	MH106729	99.76	Brezilya
KSTM-281	IV4	AB563124	99.88	İtalya
	I12	AF197552	99.88	İtalya
	Brazilian	MH106729	99.76	Brezilya
ANKR-617	IV4	AB563124	99.88	İtalya
	I12	AF197552	99.88	İtalya
	Brazilian	MH106729	99.76	Brezilya

*BLASTx'e göre en yüksek benzerliğe sahip ilk üç BNYVV izolatı verilmiştir.

İzolatların kendi aralarındaki amino asit (aa) düzeyindeki benzerliklerini incelemek amacıyla NCBI'daki BLASTp analizi kullanılmıştır. Buna göre; GZNP-27, SMSN-61, EDRN-125, BRSA-148, KSTM-281 ve KYSR-524 izolatları kendi aralarında % 100 benzerlik göstermiştir. ELZG-44, CNKL-150 ve ANKR-617 izolatları ise kendi aralarında % 99.29 oranında benzerlik göstermişlerdir. IGDR-6 izolatının ise, diğer izolatlarla benzerlik oranının % 97.16-% 97.87 olması dikkat çekmiştir (Çizelge 4. 5).



Çizelge 4.5. BNYVV izolatlarına ai P31 proteininin amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları (%)

İzolat adı	Orjin	No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IGDR-6	Iğdır	1	*	97.52	97.87	97.52	97.52	97.52	97.16	97.52	97.52	97.16
GZNP-27	Gaziantep	2	97.52	*	99.65	100	100	100	99.65	100	100	99.65
ELZG-44	Elazığ	3	97.87	99.65	*	99.65	99.65	99.65	99.29	99.65	99.65	99.29
SMSN-61	Samsun	4	97.52	100	99.65	*	100	100	99.65	100	100	99.65
EDRN-125	Edirne	5	97.52	100	99.65	100	*	100	99.65	100	100	99.65
BRSA-148	Bursa	6	97.52	100	99.65	100	100	*	99.65	100	100	99.65
CNKL-150	Çanakkale	7	97.16	99.65	99.29	99.65	99.65	99.65	*	99.65	99.65	99.29
KSTM-281	Kastamonu	8	97.52	100	99.65	100	100	100	99.65	*	100	99.65
KYSR-524	Kayseri	9	97.52	100	99.65	100	100	100	99.65	100	*	99.65
ANKR-617	Ankara	10	97.16	99.65	99.29	99.65	99.65	99.65	99.29	99.65	99.65	*

Bu çalışmada incelenen 10 BNYVV izolatının P31 gen bölgesinde farklılık belirlenen aa pozisyonları Çizelge 4. 6’da gösterilmiştir (EK-4). Buna göre; IGDR-6 izolatının diğer izolatlardan aa bakımından yedi pozisyonda farklılık sergilediği görülmüştür (Çizelge 4. 6).

Çizelge 4.6. BNYVV izolatlarının P31 gen bölgesinde farklılık belirlenen amino asit pozisyonları

İzolat Adı	Amino Asit Pozisyon Numarası								
	14	56	105	140	144	153	198	207	237
IGDR-6	P	I	I	A	D	I	F	F	D
GZNP-27	L	T	V	A	N	M	I	S	D
ELZG-44	L	T	V	A	N	M	F	S	D
SMSN-61	L	T	V	A	N	M	I	S	D
EDRN-125	L	T	V	A	N	M	I	S	D
BRSA-148	L	T	V	A	N	M	I	S	D
CNKL-150	L	T	V	A	N	M	I	S	V
KSTM-281	L	T	V	A	N	M	I	S	D
KYSR-524	L	T	V	A	N	M	I	S	D
ANKR-617	L	T	V	V	N	M	I	S	D

P31 genom bölgesi için bu çalışmadaki BNYVV izolatları Dünya izolatları ile BLASTp yöntemi ile karşılaştırıldığında, Türkiye’den elde edilen izolatlar yine iki gruba ayrılmıştır. IGDR-6 izolatı Kazakistan’a ait Kas2 izolatı ile, GZNP-27, SMSN-61, EDRN-125, BRSA-148, KSTM-281 ve KYSR-524 izolatları ise İtalya’ya ait I12 izolatı ile % 100 benzer bulunmuştur. Diğer taraftan; ELZG-44, CNKL-150 ve ANKR-617 izolatları ise yine İtalyan izolatı I12 ile % 99.65 oran ile en yüksek benzerliği göstermişlerdir (Çizelge 4. 7).

Çizelge 4.7. BNYVV izolatlarının dizi analizi yapılan P31 geninin amino asit düzeyinde Dünya izolatları ile benzerlik oranları* (%)

İzolat Adı	NCBI İzolat Adı	NCBI Kayıt No	Benzerlik Oranı (%)	Orjini
IGDR-6	Kas2	AF197554	100	Kazakistan
	M87	BAJ23820	99.65	Japonya
	O11	BAJ23818	99.65	Japonya
ELZG-44	I12	AF197552	99.65	İtalya
	Brazilian	MH106729	99.29	Brezilya
	FAH	AB563132	99.29	Fransa
GZNP-27	I12	AF197552	100	İtalya
SMSN-61	Brazilian	MH106729	99.65	Brezilya
EDRN-125				
BRSA-148				
KSTM-281	IV1	AB563123	99.65	İtalya
KYSR-524				
CNKL-150	I12	AF197552	99.65	İtalya
	Brazilian	MH106729	99.29	Brezilya
	FAH	AB563132	99.29	Fransa
ANKR-617	I12	AF197552	99.65	İtalya
	Brazilian	MH106729	99.29	Brezilya
	FAH	AB563132	99.29	Fransa

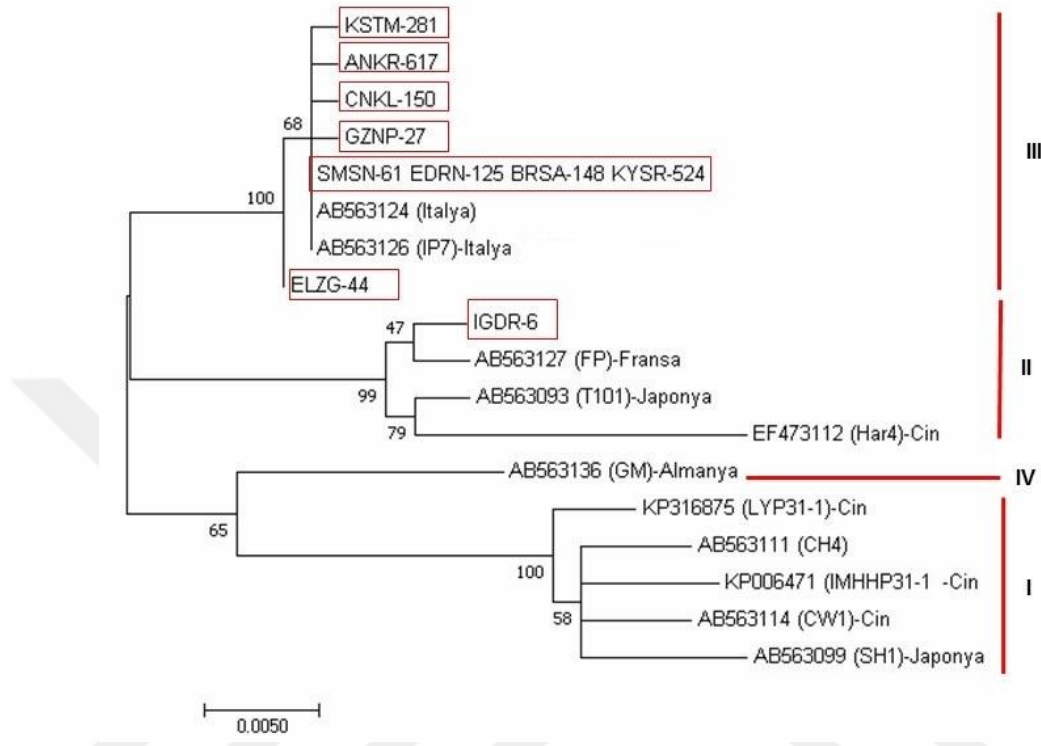
*BLASTp'e göre en yüksek benzerliğe sahip ilk üç BNYVV izolatı verilmiştir.

4.6. BNYVV İzolatlarının P31 Genine Göre Filogenetik Analizi

BNYVV izolatlarının P31 genine göre son taksonomik gruplandırılması temel alınarak, bu grupları yansıtabilecek şekilde seçilen, NCBI'dan indirilen 11 BNYVV izolatı filogenetik ağaç oluşturmada kullanılmıştır. Clustal W yöntemi ile bu izolatların P31 gen bölgelerine ait nükleotit dizileri hizalanmış ve sonra Mega 7 yazılımında Tamura-Nei modeli kullanılarak (Tamura ve Nei, 1993) genetik uzaklıklar belirlenmiş ve ML algoritmasına göre filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değeri olarak 1000 alınmıştır.

ML dendogramı incelendiğinde, GZNP-27, ELZG-44, SMSN-61, EDRN-125, BRSA-148, CNKL-150, KSTM-281, KYSR-524 ve ANKR-617 izolatlarının İtalya şeker pancarı üretim alanlarından izole edilen izolatlar (IV4 izolatı- AB563124 ve IP7 izolatı- AB563126) ile aynı alt dalda yer aldığı görülmektedir. Böylelikle, bu izolatların son taksonomik gruplandırmaya göre; P31 geni ile ilgili olarak **Grup III** içerisinde yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 4. 7). Diğer taraftan, IGDR-6 izolatının ise diğer izolatlardan farklı olarak Fransız (FP izolatı) ve Japon (T101 izolatı) izolatlarının

bulunduğu farklı bir dala ayrıldığı ve dolayısıyla **Grup II** içerisinde bulunduğu saptanmıştır (Şekil 4. 7 ve Çizelge 4. 8).

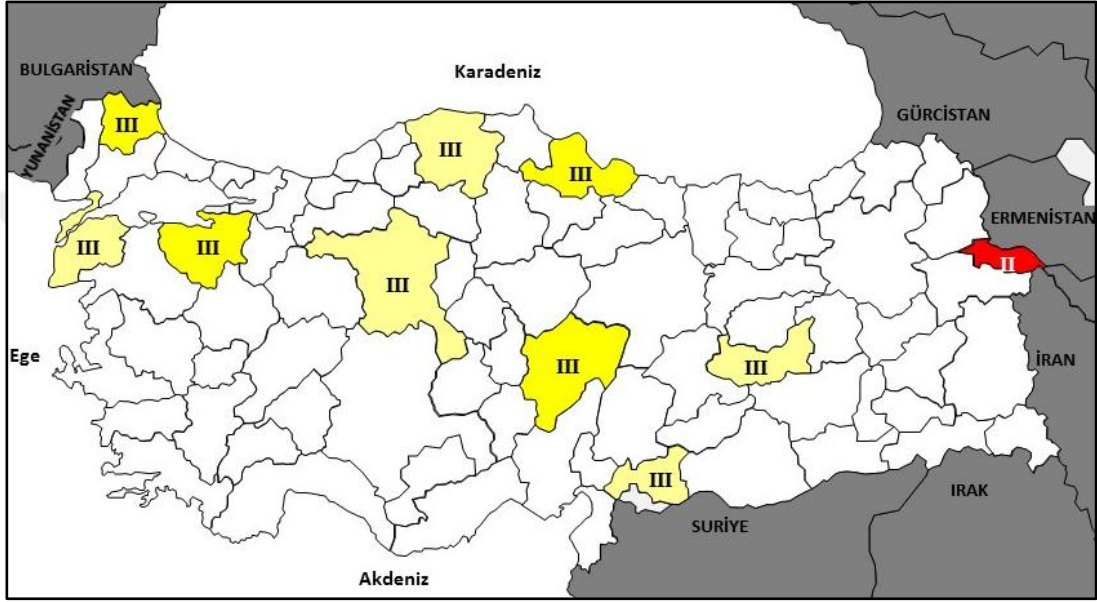


Şekil 4.7. BNYVV izolatlarının ve GenBank (NCBI) veri tabanında kayıtlı bazı BNYVV izolatlarının P31 genine göre nükleotit dizileri esas alınarak oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik analizde Maximum Likelihood yöntemi ve Tamura-Nei modeli kullanılmıştır. Dendogramda bootstrap değerleri, dallarda % olarak gösterilmiştir. Ölçek, aynı pozisyon için baz değişim miktarını göstermektedir (0.05). Referans izolatlara ait bilgiler Çizelge 4. 8’de yer almaktadır.

Çizelge 4.8. Filogenetik analizde kullanılan *Beet necrotic yellow vein virus* izolatları

GenBank Kayıt No	NCBI İzolat Adı	P31 Grubu	Ülke
AB563124	IV4	Grup III	İtalya
AB563126	IP7	Grup III	İtalya
AB563127	FP	Grup II	Fransa
AB563093	T101	Grup II	Japonya
EF473112	Har4	Grup II	Çin
AB563136	GM	Grup IV	Almanya
KP316875	LYP31-1	Grup I	Çin
AB563111	CH4	Grup I	Çin
KP006471	IMHHP31-1	Grup I	Çin
AB563114	CW1	Grup I	Çin
AB563099	SH1	Grup I	Japonya

Türkiye şeker pancarı üretim alanlarından elde edilen BNYVV izolatlarının P31 geni gruplarına (Grup II ve Grup III) göre dağılımları Şekil 4. 8’de gösterilmiştir. Diğer taraftan, farklı coğrafik lokasyonlarda bulunmalarına rağmen, Edirne (EDRN-125), Bursa (BRSA-148), Samsun (SMSN-61) ve Kayseri (KYSR-524) illerinden elde edilen dört BNYVV izolatının genetik bakımdan nükleotit düzeyinde % 100 benzer olmaları dikkat çekmiştir (Çizelge 4. 2; haritada koyu sarı renk ile belirtilmiştir).



Şekil 4.8. P31 genine göre BNYVV izolatlarında belirlenen grupların Türkiye şeker pancarı üretim alanlarında dağılımları (Grup II içerisinde yer alan BNYVV izolatının elde edildiği il kırmızı renk ile, Grup III içerisinde yer alan BNYVV izolatlarının elde edildiği iller ise sarı renk ile işaretlenmiştir)

4.7. BNYVV'nin Sistemik Konukçuları ile Yürütülen Biyolojik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

Bu tez çalışmasının araştırma konuları içerisinde yer almamakla birlikte; teze katkı sağlayacağı düşünüldüğünden, BNYVV'nin sistemik konukçularından *N. benthamiana*, *S. oleraceae* (cv. Rick Zwan ve cv. Nebraska) ve *Beta vulgaris* (cv. Ansa-BNYVV'ye hassas) (Gilmer, 2017) biyolojik çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Nitekim bu konukçulardan *N. benthamiana*, günümüzde bitki-patojen interaksyonu çalışmalarında farklı genlerin ifadelerinin kıyaslanması ve konunun daha detaylı irdelenebilmesi amacıyla bir model bitki olarak kullanılmaktadır (Goodin

vd, 2008; Satoh vd, 2010). Bu sebeple, bu kısımda yürütülen biyolojik çalışmalar özellikle *N. benthamiana* üzerinde yoğunlaşmıştır. Onbeş farklı coğrafik lokasyondan elde edilen BNYVV izolatu (IGDR-6, GZNP-27, ELZG-44, SMSN-61, TKAT-106, EDRN-125, KRLR-134, BRSA-148, CNKL-150, ESHR-225, KSTM-281, ADPZ-291, KYSR-524, KTHY-602 ve ANKR-617-3) kullanılarak bu bitki türlerinde çalışmalar yürütülmüş ve izolatların meydana getirdiği reaksiyonlar gözlenmiş, izolatlar arasında herhangi bir farklılık olup olmadığı araştırılmıştır.

Bu amaçla; 15 BNYVV izolatının *N. benthamiana* bitkilerine üç tekerrürlü olarak toplam 45 bitkiye, *B. vulgaris* (cv. Ansa-BNYVV'ye hassas) ve *S. oleraceae* (cv. Rick Zwan ve cv. Nebraska)'ya ait ise 1'er bitkiye (45 adet) olmak üzere toplam 90 bitkiye mekaniksel olarak inokulasyonları gerçekleştirilmiştir. İnokulasyonu takiben 1-4 hafta içerisinde, test bitkilerinde oluşan belirtiler kayıt edilmiş ve her bir bitkinin fotoğrafı çekilmiştir. Bu belirtilerin BNYVV enfeksiyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını tespit etmek amacıyla; inokulasyondan dört hafta sonra, her bir test bitkisinin virüs inokulasyonu yapılmayan üst kısmından (simptom oluşumu gözlenen ya da gözlenmeyen) 1'er yaprağı alınarak ELISA ile test edilmiştir (Çizelge 4. 9 ve Çizelge 4. 18).

4.7.1. BNYVV İzlatları ile İnokule Edilen *N. benthamiana* Bitkilerinde Yürütülen Biyolojik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

BNYVV'nin sistemik konukçusu olan *N. benthamiana* bitkisinde, üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilen mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda; İnokulasyondan 4 hafta sonra 15 BNYVV izolatının tamamının, bu bitkinin virüs inokulasyonu yapılmayan üst yapraklarında genellikle kıvrılma, mozayik, ilerleyen aşamalarda nekrotik lekeler şeklinde, tipik BNYVV'nin neden olduğu belirtilere benzer belirtiler oluşturduğu gözlenmiştir. Ayrıca, izolatların bazılarının ise bitkide cüceleşmeye neden olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4. 9). Bu BNYVV izolatlarının herbirinin *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler, Şekil 4. 9.-Şekil 4. 23'te gösterilmiştir.

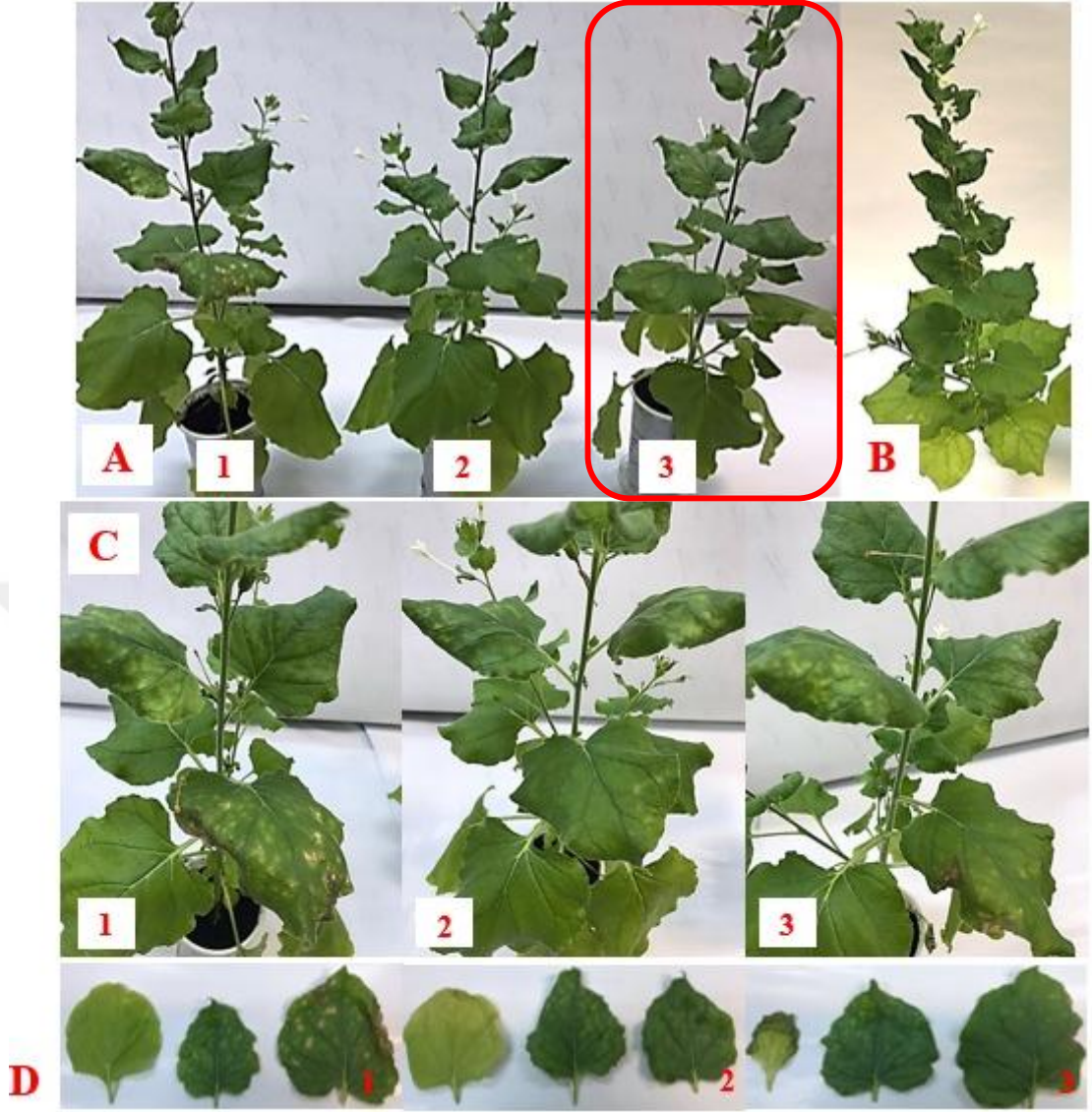
Daha sonra, *N. benthamiana* bitkilerinin üst yapraklarından alınan örneklerle uygulanan DAS-ELISA testi sonucunda, sadece GZNP-27 izolatının 2. tekerrüründe BNYVV enfeksiyonu serolojik olarak belirlenmiştir (Çizelge 4. 9).

Çizelge 4.9. BNYVV izolatların *N. benthamiana* bitkilerinin tekerrürlerinde oluşturduğu simptomlar ve ELISA testi sonuçları

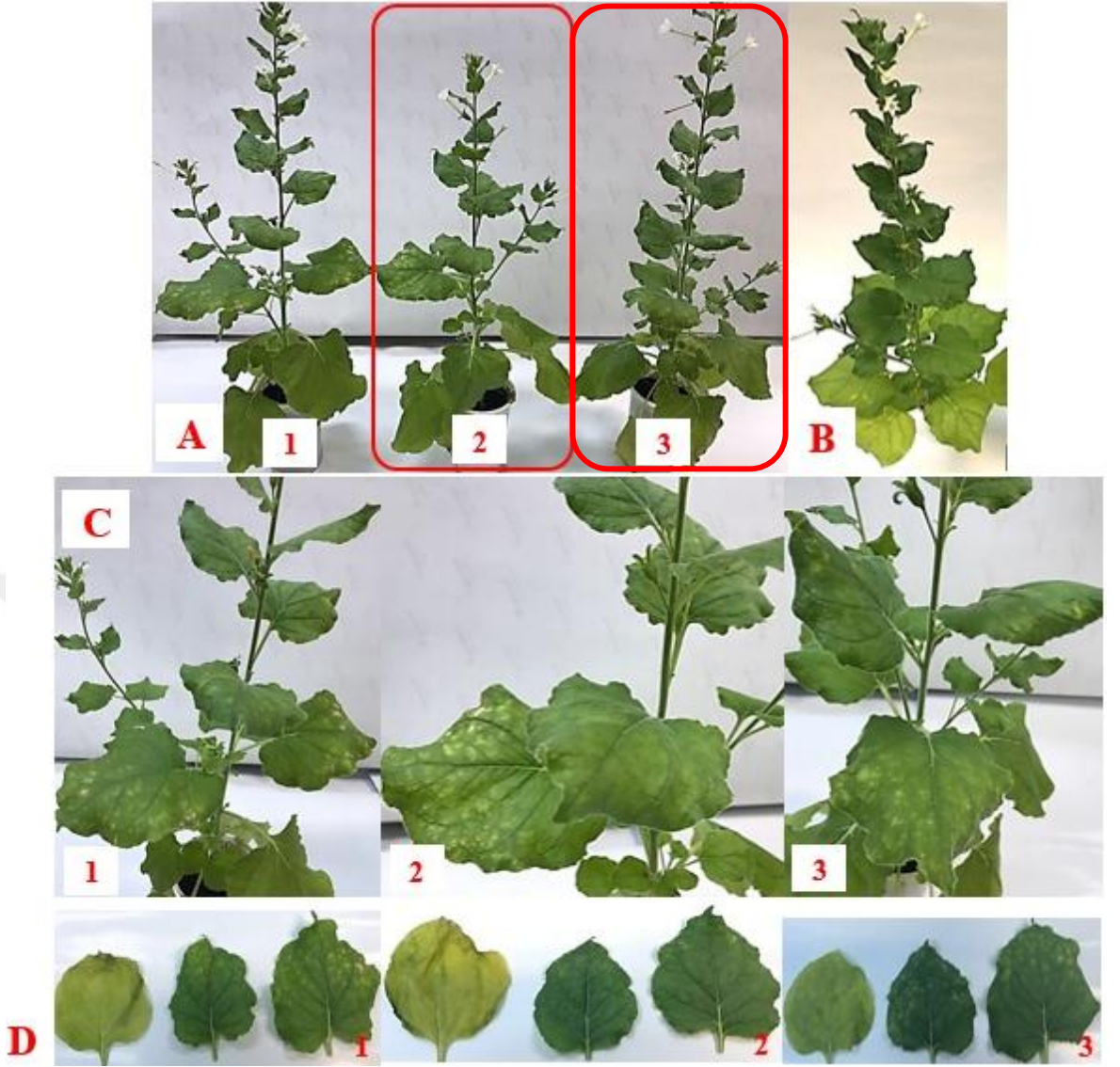
İzolat Adı	<i>Nicotiana benthamiana</i>					
	1. Tekerrür		2. Tekerrür		3. Tekerrür	
	Simptom*	ELISA Absorbans Değeri**	Simptom*	ELISA Absorbans Değeri**	Simptom*	ELISA Absorbans Değeri**
IGDR-6	M, YK	0.106 (-)	M, YK	0.123 (-)	M, NL, YK	0.166 (-)
GZNP-27	M, YK	0.098 (-)	M, YK, C	0.386 (+)	M, YK	0.129 (-)
ELZG-44	M, NL, YK	0.111 (-)	M, NL, YK	0.100 (-)	M, NL, YK	0.090 (-)
SMSN-61	M, NL, YK	0.112 (-)	M, NL, YK	0.097 (-)	M, YK	0.091 (-)
TKAT-106	M, NL, YK	0.096 (-)	M, NL, YK	0.104 (-)	M, YK	0.102 (-)
EDRN-125	M, YK	0.097 (-)	M, NL, YK	0.105 (-)	M, NL, YK	0.101 (-)
KRLR-134	M, YK, C	0.150 (-)	M, YK	0.109 (-)	M, NL, YK	0.101 (-)
BRSA-148	M, NL, YK	0.104 (-)	M, NL, YK, HC	0.099 (-)	M, YK	0.103 (-)
CNKL-150	M, YK, C	0.127 (-)	M, NL, YK	0.100 (-)	KL, NL, YK, C	0.137 (-)
ESHR-225	M, NL, YK, C	0.119 (-)	KL, YK, C	0.106 (-)	M, NL, YK	0.106 (-)
KSTM-281	M, NL, YK	0.107 (-)	M, NL, YK	0.103 (-)	M, NL, YK	0.102 (-)
ADPZ-291	M, NL, YK	0.102 (-)	M, NL, YK	0.121 (-)	M, NL, YK	0.114 (-)
KYSR-524	M, NL, YK, C	0.105 (-)	M, NL, YK, C	0.101 (-)	M, NL, YK, C	0.093 (-)
KTHY-602	M, NL, YK, HC	0.101 (-)	M, NL, YK	0.099 (-)	M, NL, YK	0.107 (-)
ANKR-617	M, YK, C	0.111 (-)	M, NL, YK	0.113 (-)	M, YK, C	0.124 (-)
-C (Bioreba)		0.098		0.098		0.098

*: C: Cüceleşme, HC: Hafif Cüceleşme, M: Mozayik, NL: Nekrotik Leke, YK: Yapraklarda dıştan içe doğru kıvrılma

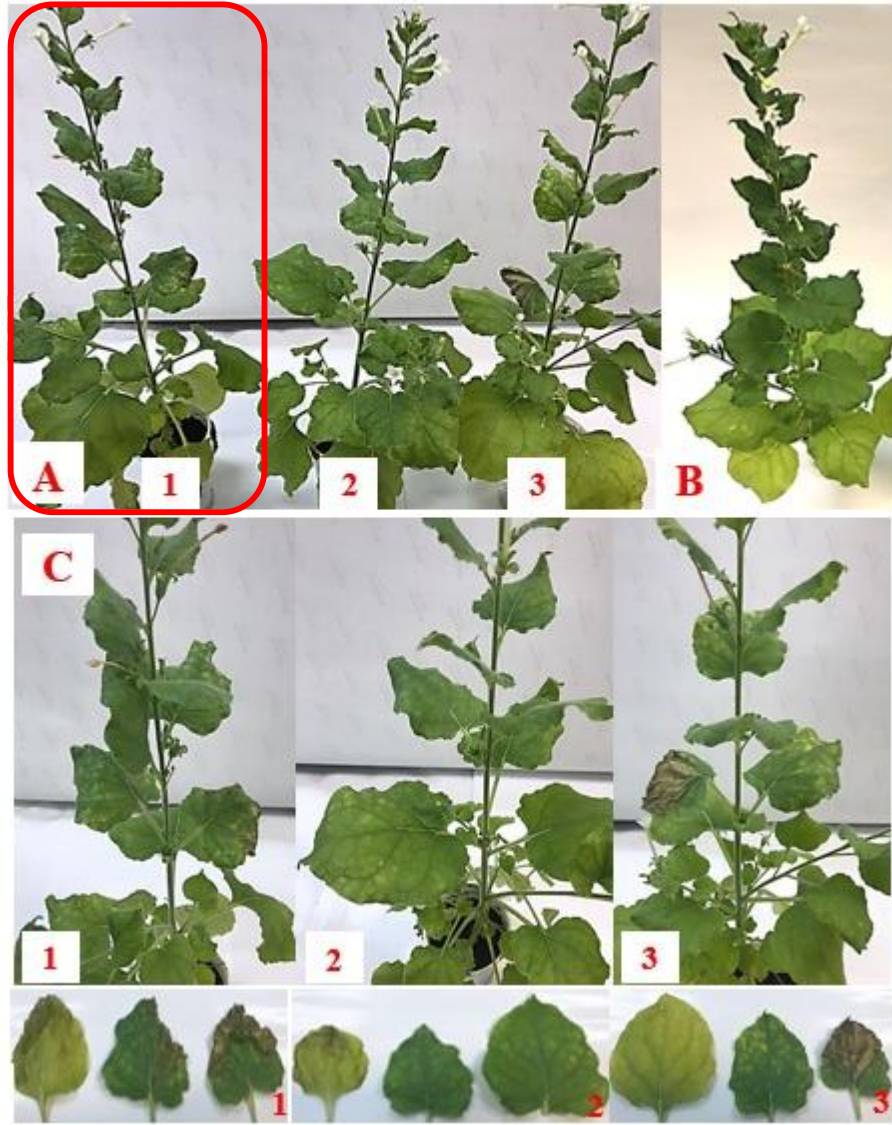
** : Mekanik inokulasyon sonrasında uygulanan ELISA testinde 2 h'lik substrat inkubasyonu sonucu elde edilen ELISA değeri ortalamaları; + = bioraba negatif kontrolün 2 katından fazla olan ELISA absorbans değerleri



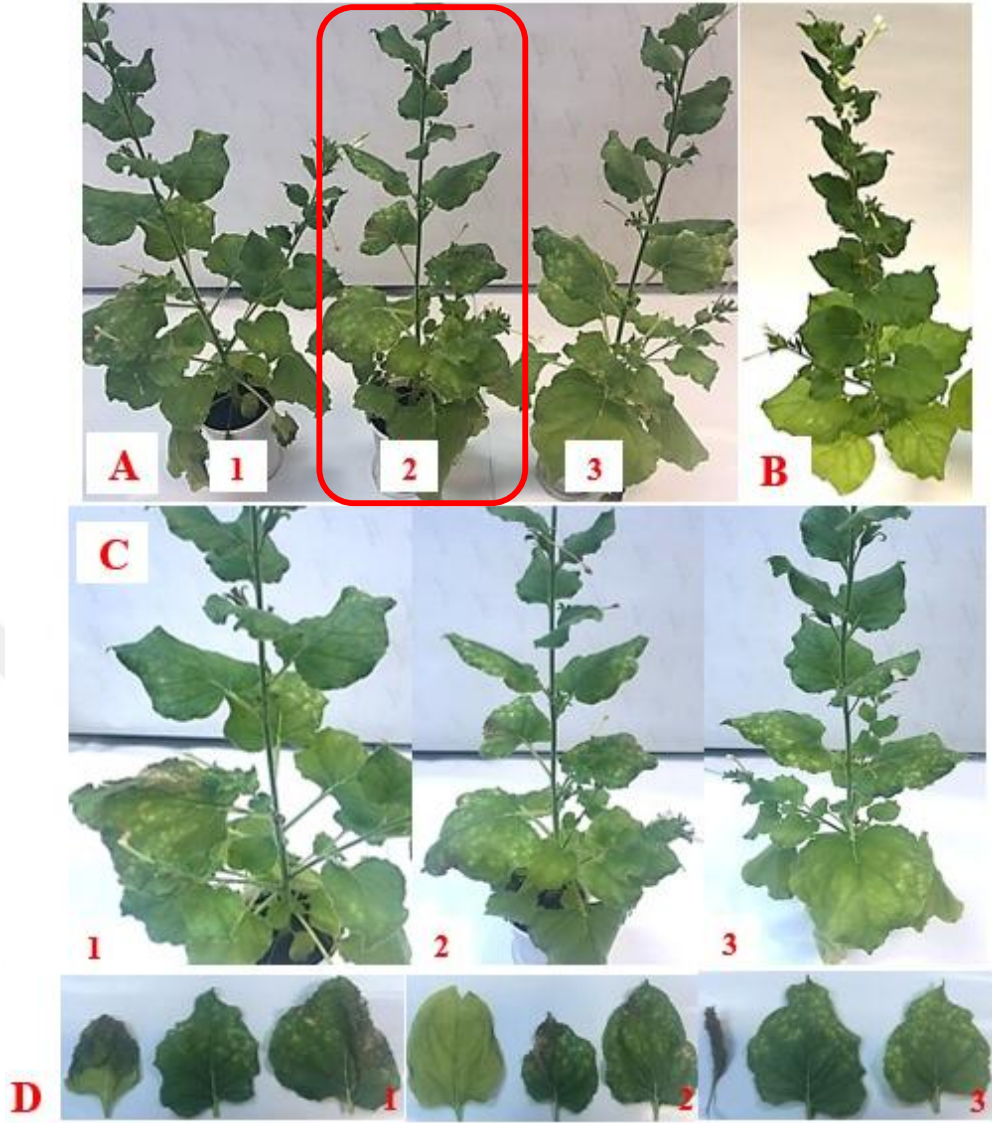
Şekil 4.9. IGDR-6 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



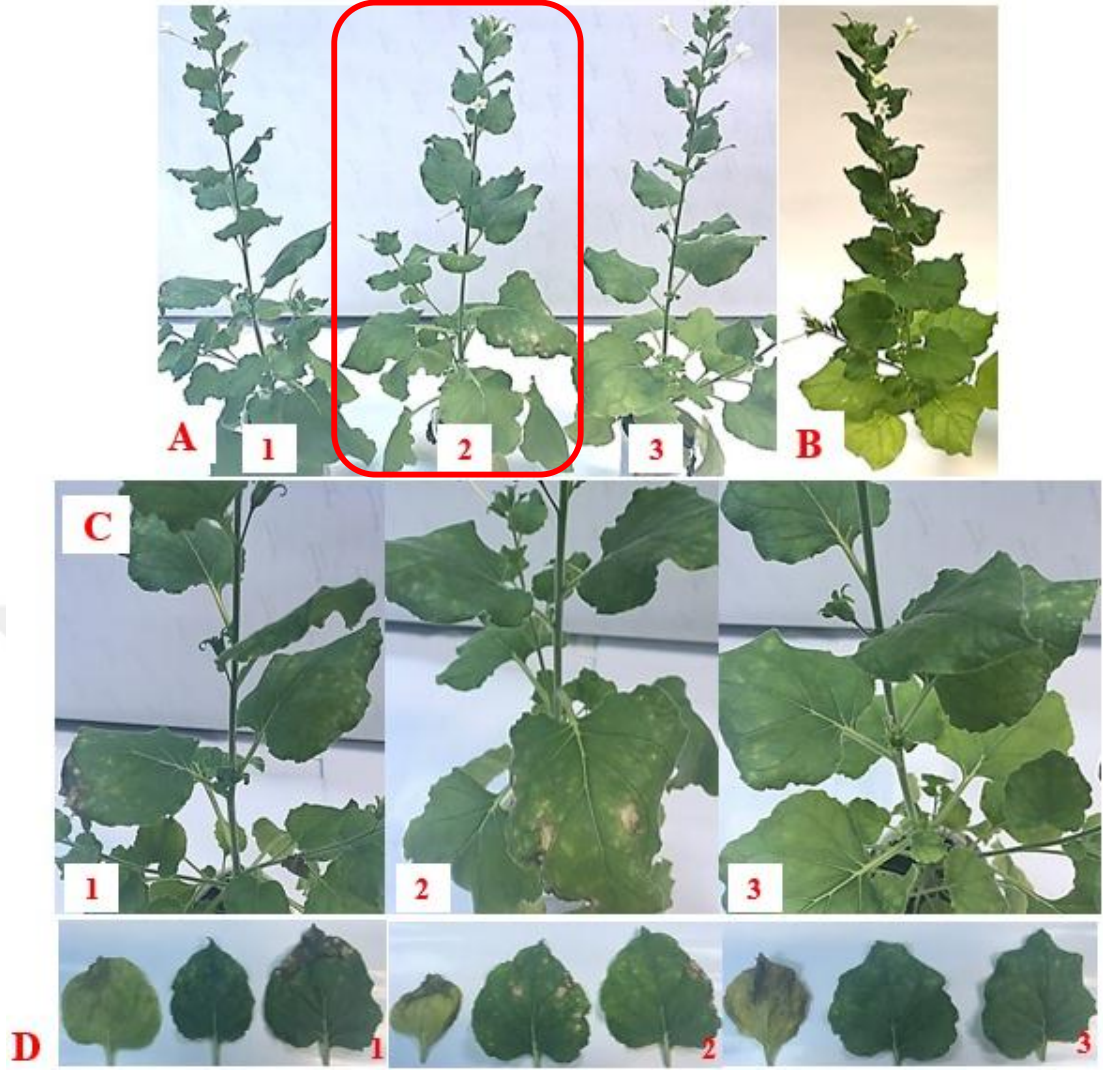
Şekil 4.10. GZNP-27 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



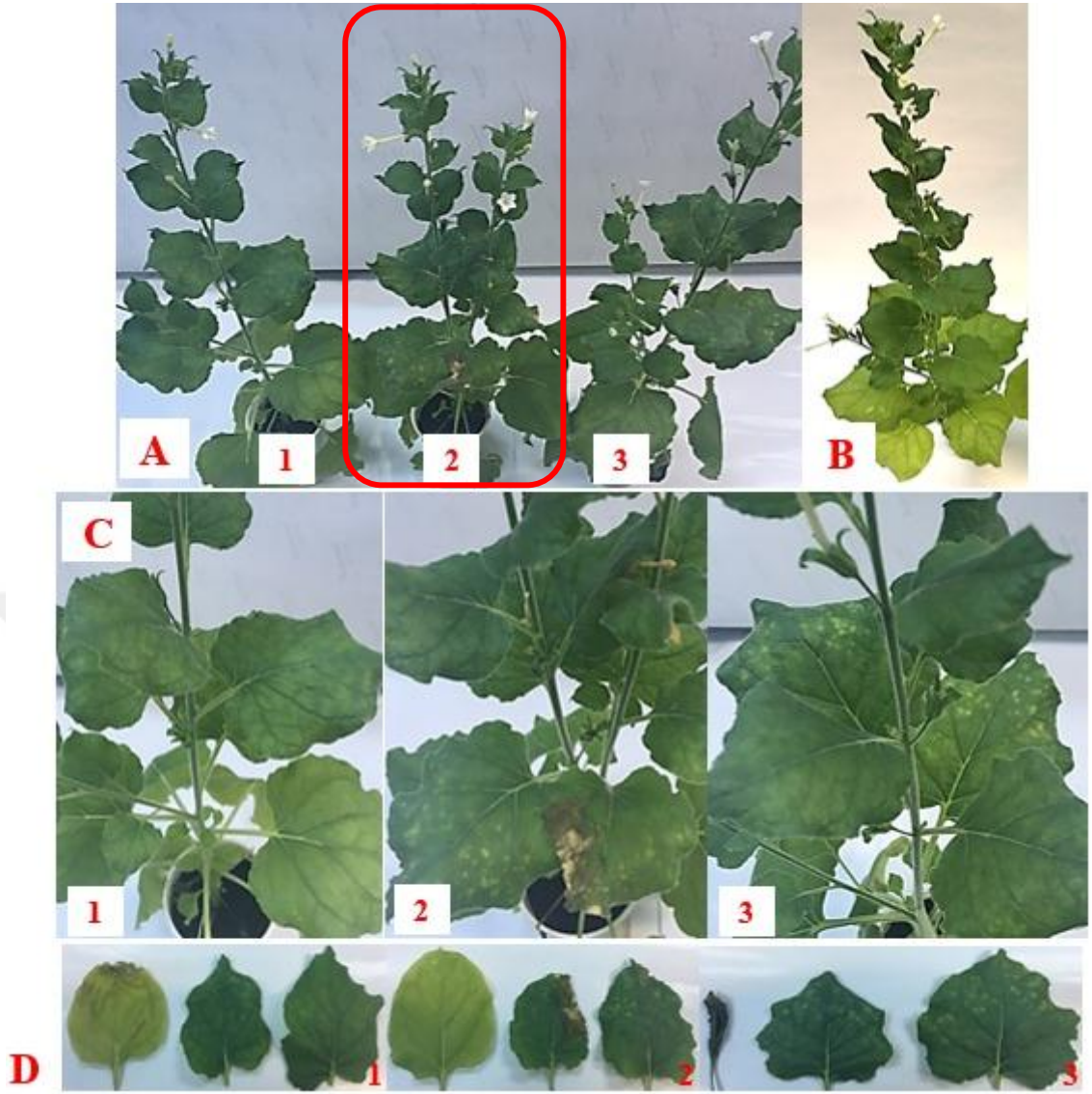
Şekil 4.11. ELZG-44 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



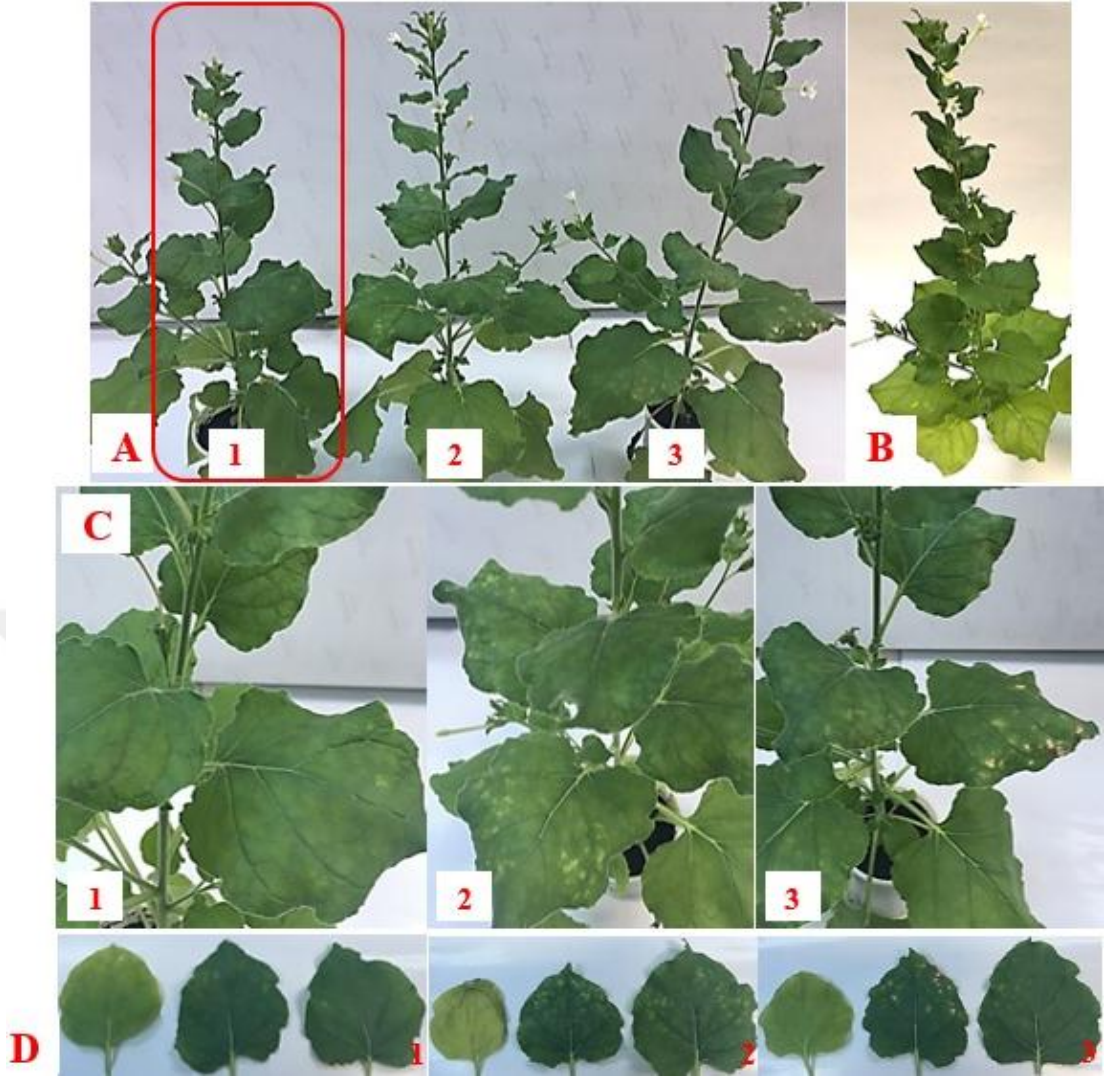
Şekil 4.12. SMSN-61 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



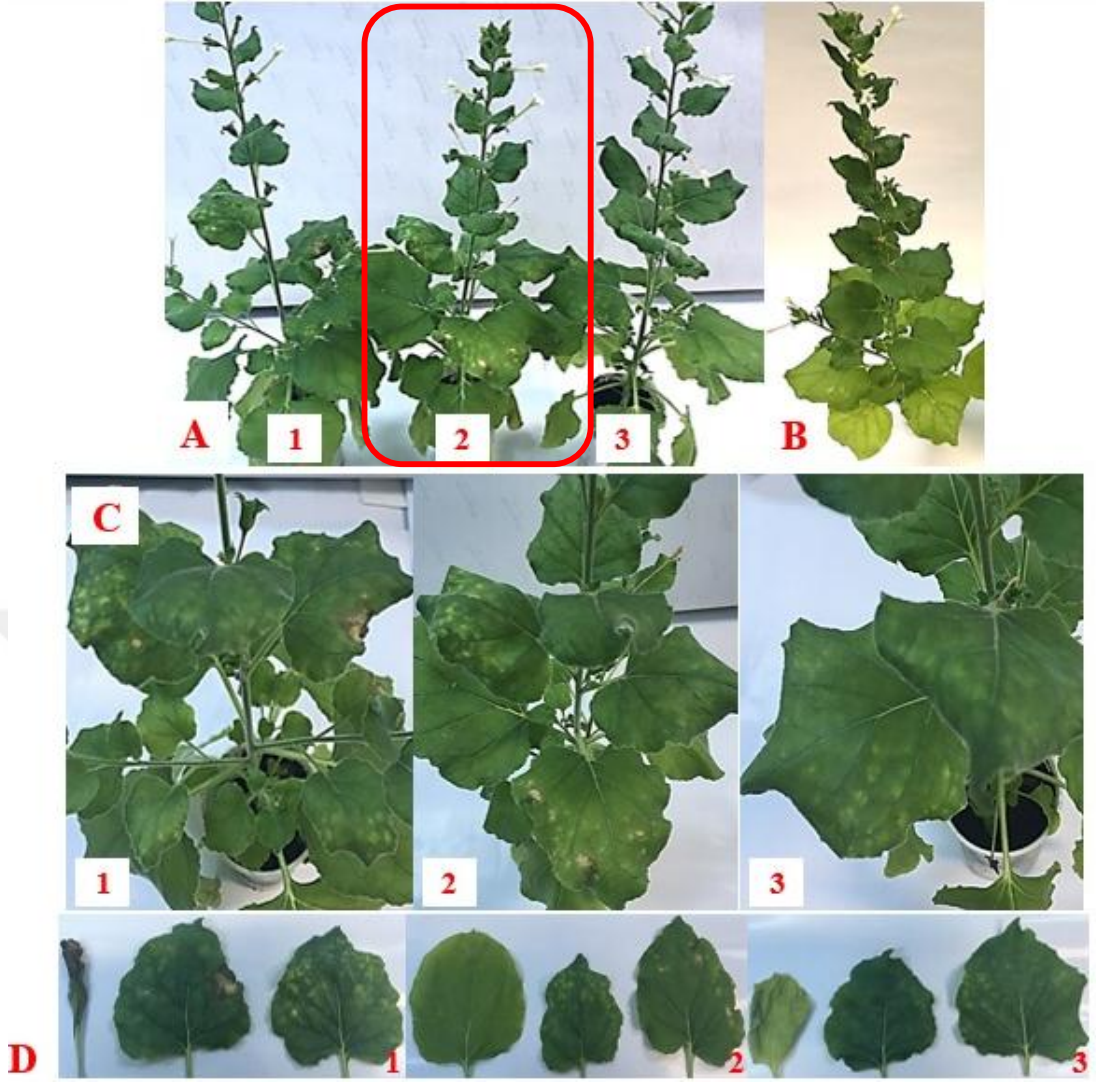
Şekil 4.13. TKAT-106 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



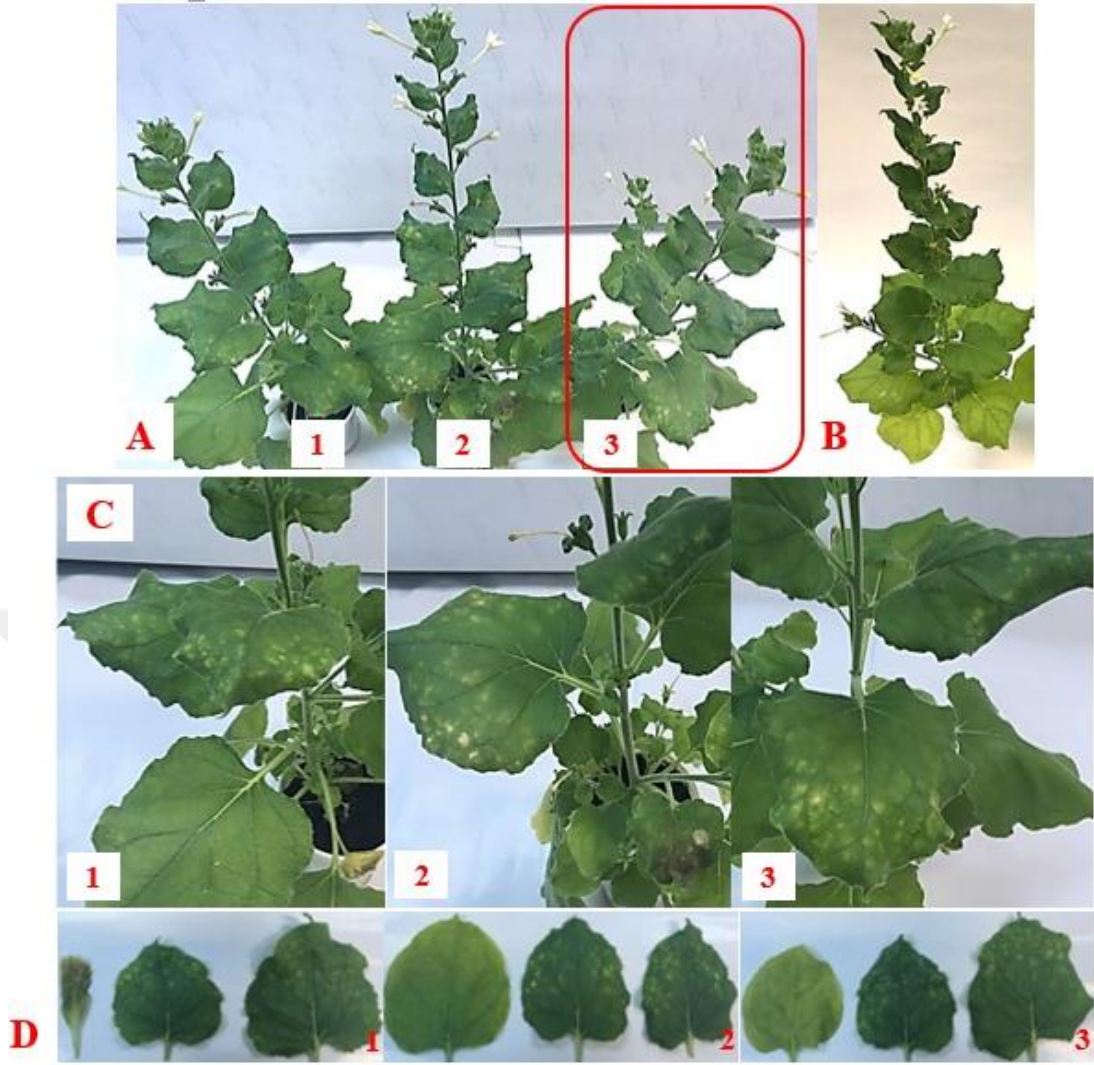
Şekil 4.14. EDRN-125 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



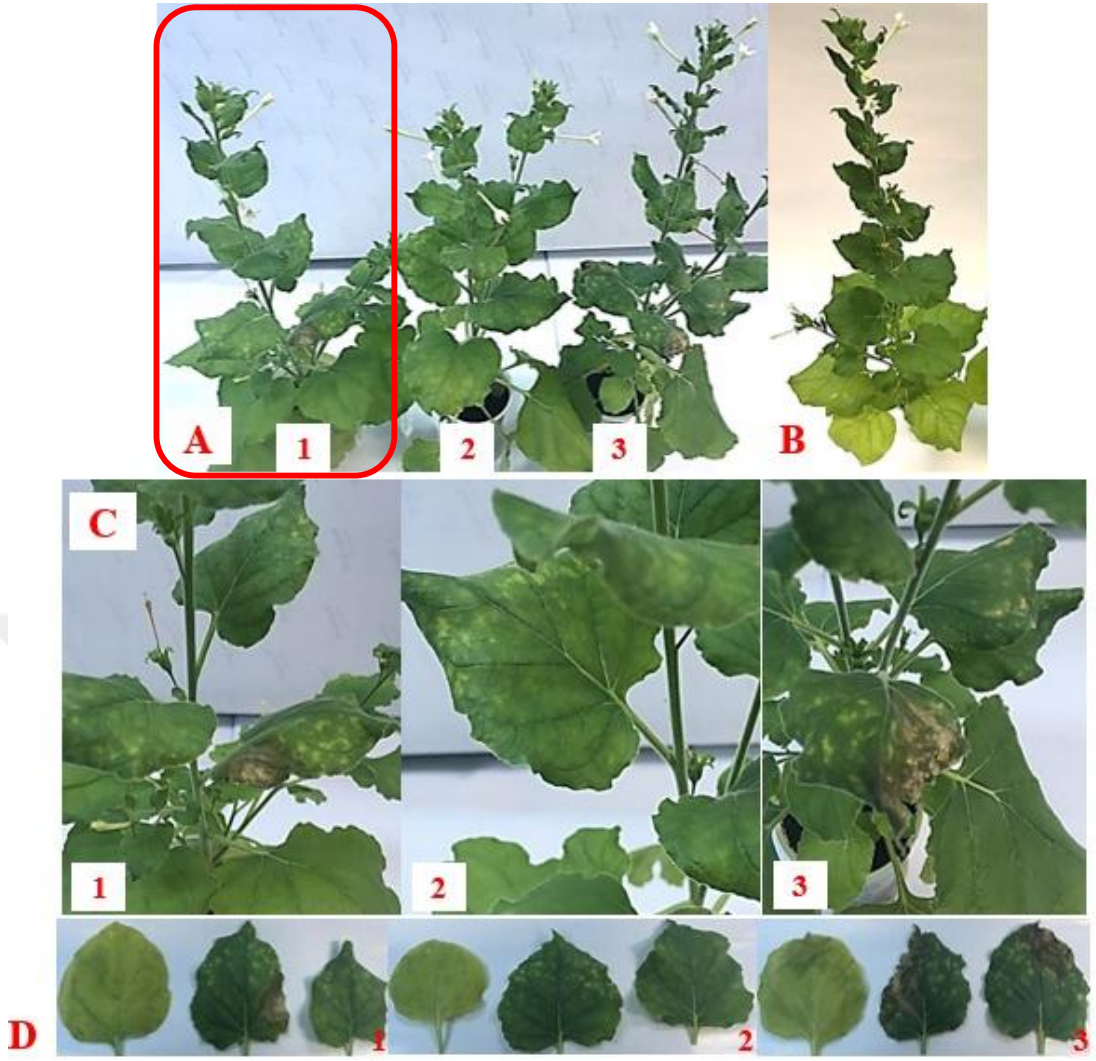
Şekil 4.15. KRKL-134 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



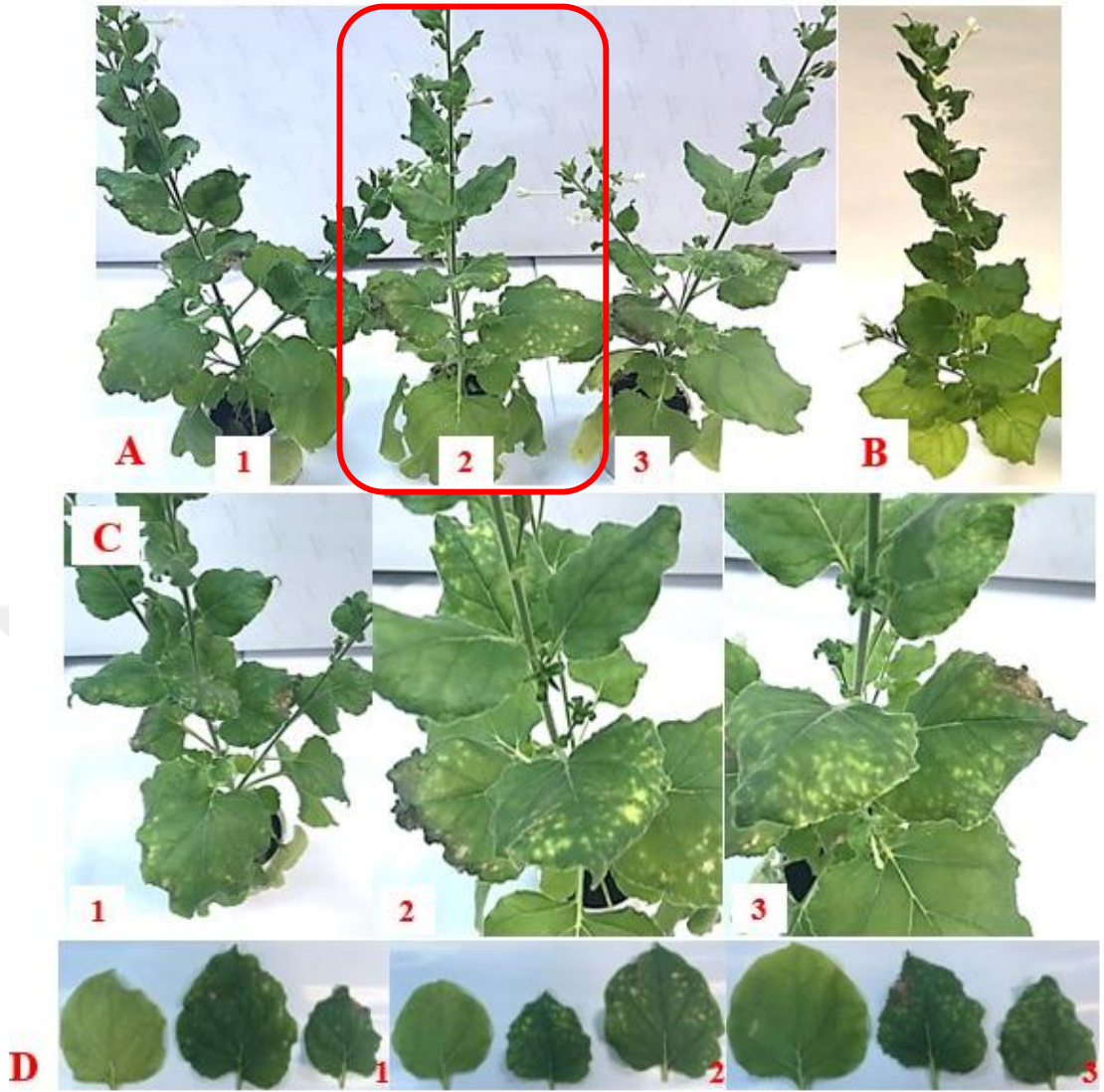
Şekil 4.16. BRSA-148 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



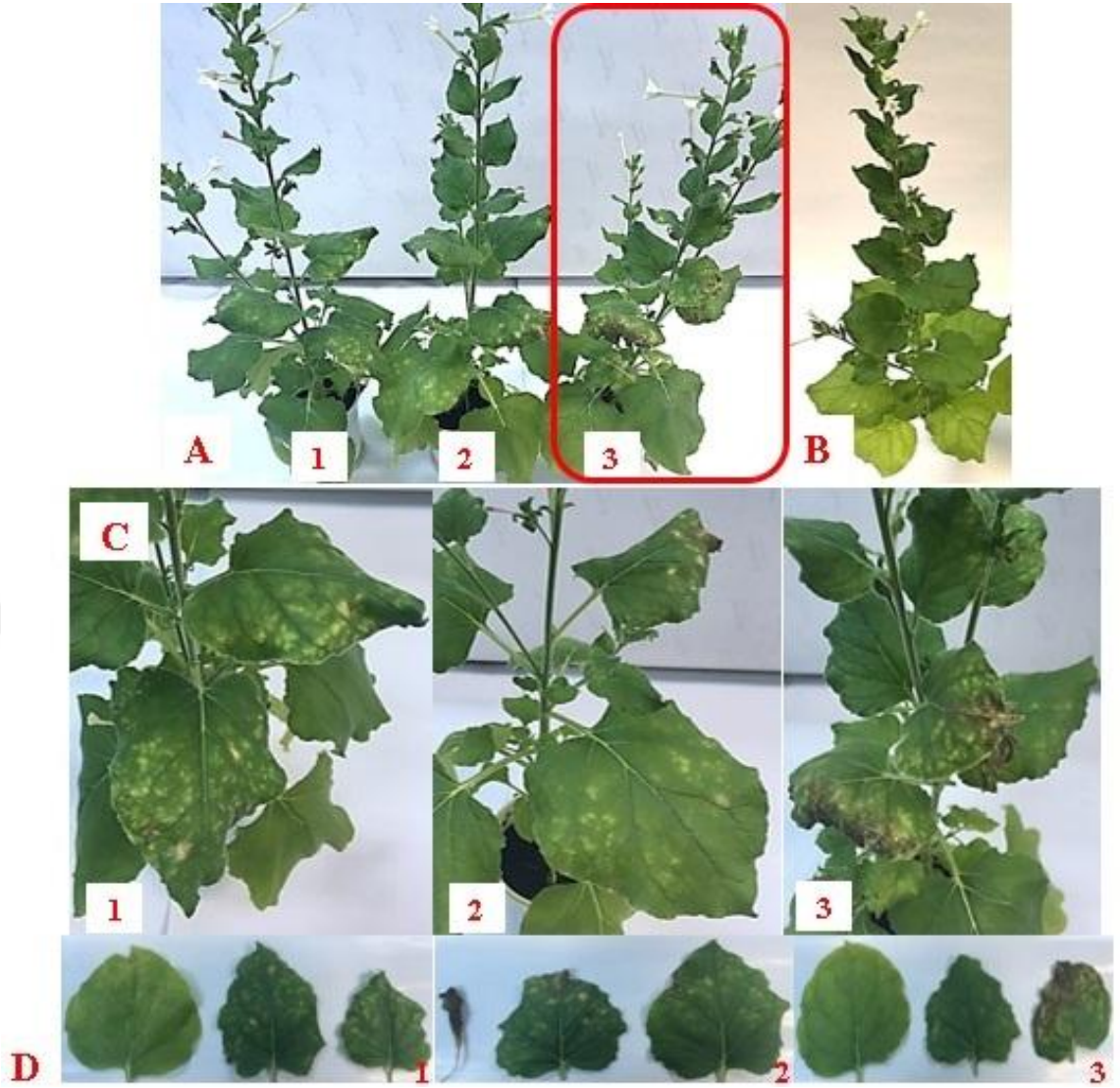
Şekil 4.17. CNKL-150 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



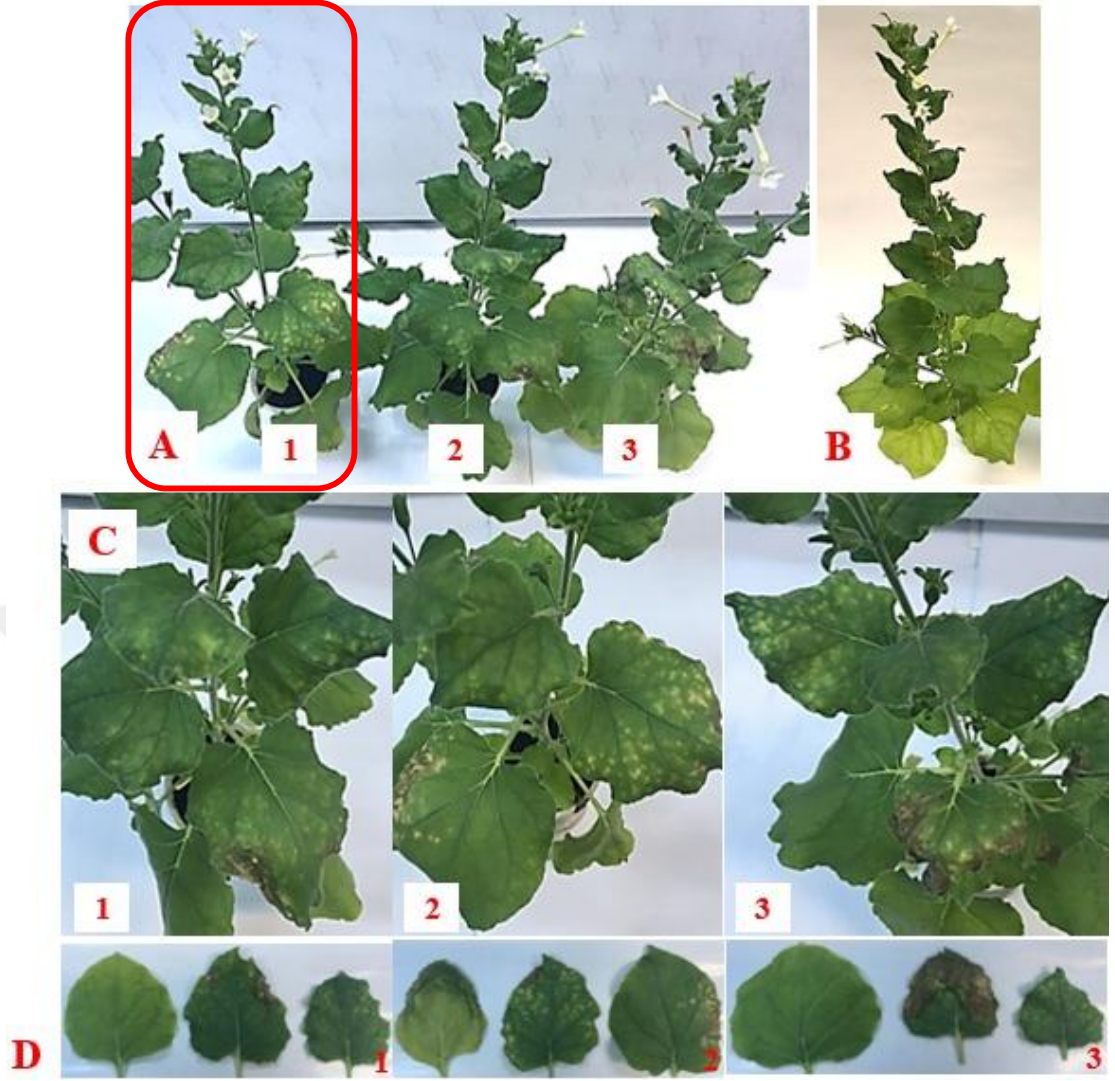
Şekil 4.18. ESHR-225 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



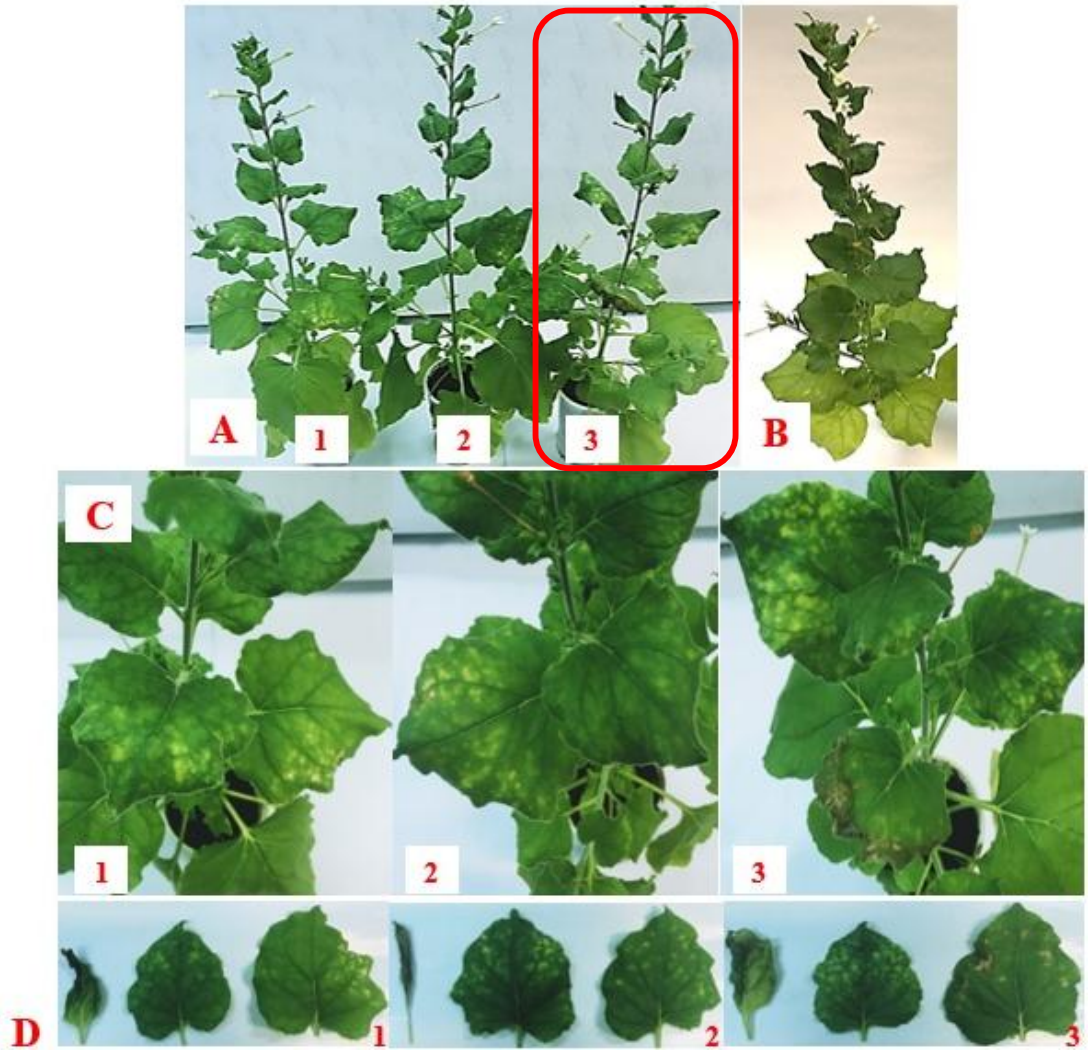
Şekil 4.19. KSTM-281 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



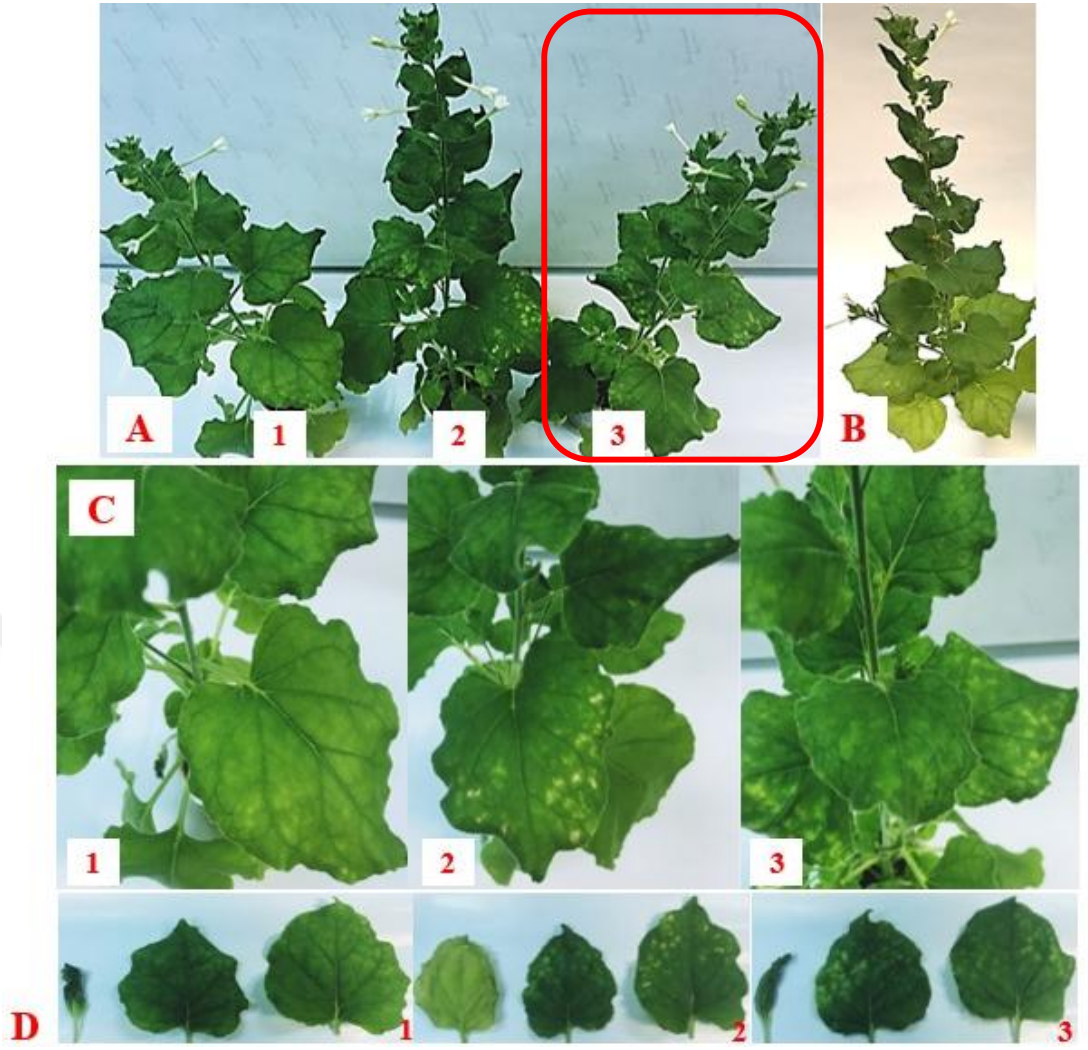
Şekil 4.20. ADPZ-291 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



Şekil 4.21. KYSR-524 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



Şekil 4.22. KTHY-602 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



Şekil 4.23. ANKR-617 izolatının mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *N. benthamiana* bitkisinin tekerrürlerinde oluşturduğu belirtiler (A) ve sağlıklı *N. benthamiana* bitkisinin genel görünümü (B), virüs-inokule edilmeyen yapraklarda oluşan iri sarı renkli mozayik ve nekrotik lezyonlar (C) ile virüs-inokule edilmiş ve inokule edilmemiş yaprakların durumları; Soldaki ilk yaprak: virüs-inokule edilmiş; diğer 2 yaprak: virüs-inokule edilmemiş olanları göstermektedir (D) (Kırmızı çerçeve içerisinde alınan tekerrür, RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)

4.7.2. BNYVV İzlatları ile İnokule Edilen *N. benthamiana* Bitkilerinde Yürütülen Moleküler Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

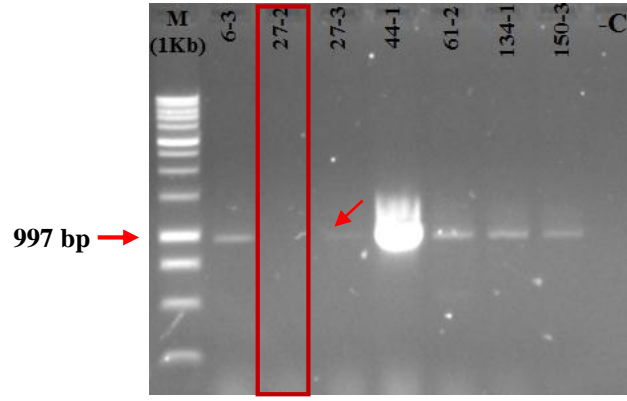
Nicotiana benthamiana bitkilerinde moleküler çalışmalar iki farklı amaç için gerçekleştirilmiştir. Bunlardan birincisi, farklı BNYVV izolatları ile üç tekerrürlü olarak virüs inokulasyonu yapılan bu bitkilerde, yaklaşık bir ay sonra gözlenen belirtilerin virüs enfeksiyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığının net olarak ortaya konulabilmesi içindir. İkinci amaç ise; model bir bitki olan *N. benthamiana*'da enfeksiyon esnasında oluşan ve BNYVV'nin patojenitesinde rol oynayan diğer bazı önemli proteinlerin (CP, P25, P31 ve P26) genlerinin detaylı olarak araştırılmasıdır. Bu amaçlarla, bitkinin virüs inokulasyonu yapılmayan üst yapraklarından örnekleme yapılmış ve RNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır. Maliyetinin yüksek olması nedeniyle, RNA izolasyonu çalışmaları bu izolatlara ait tekerrürlerin tamamında gerçekleştirilememiş, ancak her bir izolata ait birer tekerrür seçilerek çalışmalar yürütülmüştür. Bu izolatlara ait tekerrürlerin seçiminde, ELISA absorbans değerleri (en yüksek absorbans değeri) (Çizelge 4. 10) ve bitkide sergilediği belirtiler göz önüne alınmıştır (Şekil 4. 9- Şekil 4. 23). Ancak, GZNP-27 izolatında ELISA sonucu pozitif olarak belirlenen 2. tekerrürün yanısıra, bu değer negatif olan 3. tekerrür de RNA izolasyonu çalışmasına dâhil edilmiştir. Buna göre; incelenen BNYVV izolatlarında seçilen tekerrürlere ait bilgiler Çizelge 4. 10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Mekanik olarak BNYVV ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinden moleküler çalışmalar için seçilen BNYVV izolatlarına ait veriler

İzolat Adı	Seçilen Tekerrür	ELISA Absorbans Değeri	Makroskopik Gözlem Sonuçları*
IGDR-6	3.	0.166 (-)	YK, M, NL
GZNP-27	2.	0.386 (+)	YK, M, C
	3.	0.129 (-)	YK, M
ELZG-44	1.	0.111 (-)	YK, M, NL
SMSN-61	2.	0.097 (-)	YK, M, NL
TKAT-106	2.	0.104 (-)	YK, M, NL
EDRN-125	2.	0.105 (-)	YK, M, NL
KRLR-134	1.	0.150 (-)	YK, M
BRSA-148	2.	0.099 (-)	YK, M, NL, HC
CNKL-150	3.	0.137 (-)	YK, M, NL, C
ESHR-225	1.	0.119 (-)	YK, M, NL
KSTM-281	2.	0.103 (-)	YK, M, NL
ADPZ-291	3.	0.114 (-)	YK, M, NL
KYSR-524	1.	0.105 (-)	YK, M, NL, C
KTHY-602	3.	0.107 (-)	YK, M, NL
ANKR-617	3.	0.124 (-)	YK, M, C

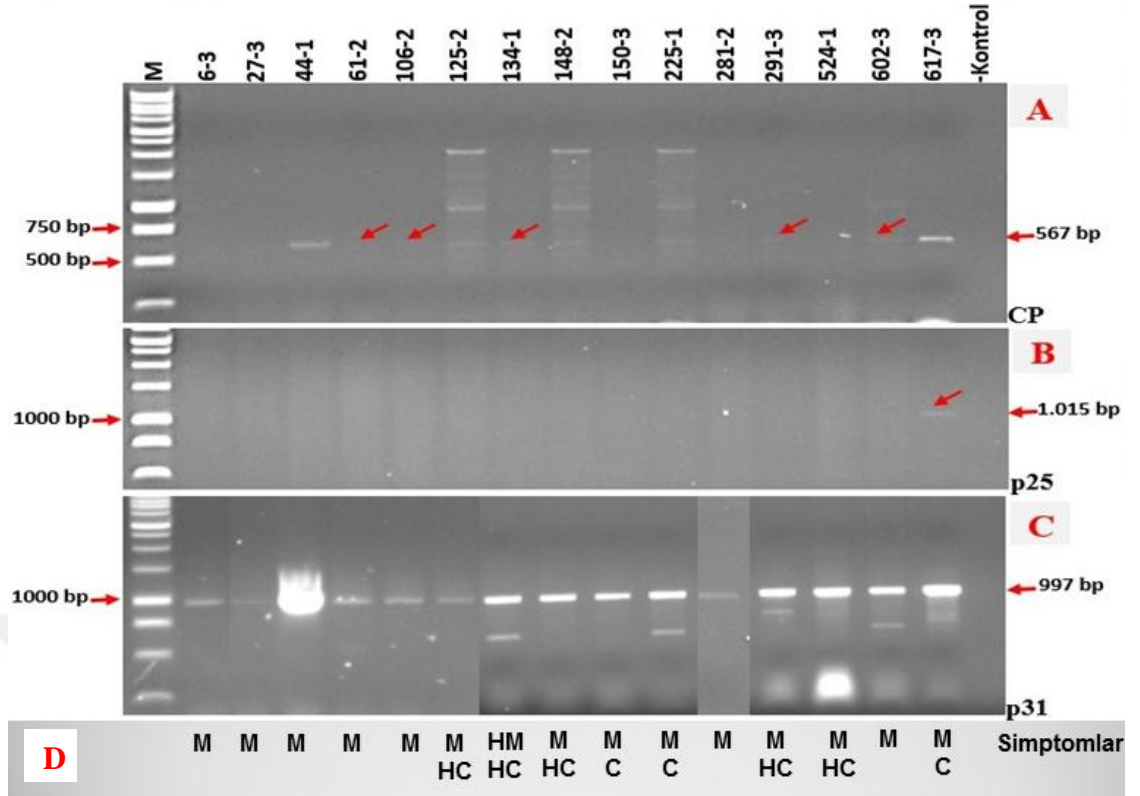
* HC: Hafif cüceleşme, C: Cüceleşme, M: Mozayik, NL: Nekrotik leke, YK: Yapraklarda kıvrılma

RNA izolasyonunu takiben, *N. benthamiana* bitkilerinde RT-PCR çalışmalarına öncelikle projenin konusunu oluşturan P31 geninin araştırılması ile başlanılmıştır. Nitekim bu bitkide yapraklarda oluşan şiddetli mozayik, kıvrılma ve bitkide cüceleşme şeklindeki "şiddetli semptomların" BNYVV RNA-4'ü tarafından kodlanan P31 proteini ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Rahim vd, 2007; Wang vd, 2011). P31 geninin çoğaltılması amacıyla uygulanan RT-PCR çalışmaları, Superscript I One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* DNA Polymerase kiti (Invitrogen) kullanılarak tek aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İncelenen 16 örneğin 15'inde P31 genine spesifik beklenen büyüklükte (977 bp) ürün elde edilmiştir. Bununla birlikte; KRLR-134-1, ESHR-225-1 ve KTHY-602-3 izolatlarında spesifik banta ilaveten; 500-750 bp arasında ve ADPZ-291-3 ve ANKR-617-3 izolatlarında ise 750-1000 bp arasında ilave bir bantın varlığı da dikkat çekmiştir (Şekil 4. 25C). İlginç olarak, yürütülen bu çalışmada, ELISA değeri pozitif olan GZNP-27 izolatının 2. tekerrüründe (GZNP-27-2) bant oluşumu gözlenmemiş, ancak ELISA değeri negatif olarak saptanan 3. tekerrüründe (GZNP-27-3) ise P31 genine spesifik 997 bp büyüklüğünde ürün elde edilmiştir (Şekil 4. 24).



Şekil 4.24. P31 geninin RT-PCR yöntemi ile amplifikasyonu [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), -C: sağlıklı şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneğinden elde edilen RNA, 6: Aralık-Iğdır, 27: İslahiye-Gaziantep, 44: Merkez-Elazığ, 61: Vezirköprü-Samsun, 134: Babaeski-Kırklareli, 150: Biga-Çanakkale illerine ait BNYVV izolatlarının *N. benthamiana*'ya aktarımı sonrasında bu bitkinin üst yapraklarından elde edilen RNA'lar]

Yürütülen RT-PCR çalışmaları sonucunda, ELISA testi ile virüs enfeksiyonu tespit edilemeyen (GZNP-27-2 hariç), *N. benthamiana* bitkilerinin tamamının BNYVV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu sonuç, *N. benthamiana* bitkilerinde BNYVV enfeksiyonunun araştırılmasında, ELISA testi çalışmalarının yeterli ve güvenilir olmadığını göstermiştir. Bu bitkide BNYVV'nin varlığının kesin olarak saptanabilmesi için, RT-PCR çalışmalarının uygulanmasının gerekliliği ortaya konulmuştur. Böylelikle, *N. benthamiana* bitkilerinde rapor edilen belirtilerin BNYVV enfeksiyonundan kaynaklandığı RT-PCR çalışmaları ile doğrulanmıştır. Diğer bir ifade ile bu çalışmada incelenen BNYVV izolatlarının tamamına ait P31 geninin, *N. benthamiana* bitkisinin üst yapraklarında bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4. 25C). Farklı tarzda; zayıf (mozaik) veya şiddetli (mozaik+cüceleşme) semptom gözlenen *N. benthamiana* bitkilerinin tamamında P31 geninin mevcut olduğu saptanmıştır (Şekil 4. 25D).



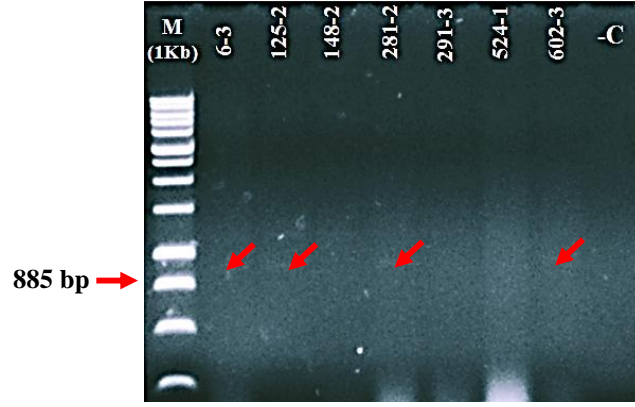
Şekil 4.25. *Nicotiana benthamiana* bitkilerinden elde edilen BNYVV izolatlarında kılıf protein (CP) (A), P25 (B) ve P31 proteinlerinin (C) RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), 6-3: Aralık-Iğdır, 27-3: İslahiye-Gaziantep, 44-1: Merkez-Elazığ, 61-2: Vezirköprü-Samsun, 106-2: Niksar-Tokat, 125-2: Merkez-Edirne, 134-1: Babaeski-Kırklareli, 148-2: Yenişehir-Bursa, 150-3: Biga-Çanakkale, 225-1: Çifteler-Eskişehir, 281-2: Taşköprü-Kastamonu, 291-3: Erenler-Adapazarı, 524-1: Merkez-Kayseri, 602-3: Simav-Kütahya, 617-3: Ayaş-Ankara illerine ait BNYVV izolatları ile inokule edilen *N. benthamiana*'nın üst yapraklarından elde edilen RNA'lar], *N. benthamiana* bitkilerinde kayıt edilen simptomlar (D)

Diğer taraftan; *N. benthamiana* bitkilerinde BNYVV izolatlarının CP geninin varlığı, RT-PCR çalışmaları ile de araştırılmıştır. Nitekim, serolojik yöntemlerden biri olan ELISA testinde tanılama, virüslerin nükleik asitlerini çevreleyen kılıf ya da membran proteinlerine ve onların özelliklerine dayalı olarak yapılmaktadır (Erkan vd, 2011). Nitekim, bu çalışmada, *N. benthamiana* bitkisinin virüs inokulasyonu yapılmayan yapraklarına uygulanan DAS-ELISA testi sonucu; 15 BNYVV izolatına ait 45 örneğin sadece birinde (GZNP-27-2) pozitif sonuç elde edilebilmiştir. Bu amaçla, *N. benthamiana*'ya ait 15 örnekte öncelikle Yöntem 3.2.5.2'e göre Omniscript RT enzimi (Qiagen) ile RT aşaması gerçekleştirilmiştir. PCR aşamasında ise; Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) enzimi kullanılmıştır. PCR

ürünlerinin jel görüntüleme cihazında incelenmesi sonucunda, örneklerin 10'unda (ELZG-44-1, SMSN-61-2, TKAT-106-2, ESHR-125-2, KRLR-134-1, BRSA-148-2, ESHR-225-1, ADPZ- 291-3, KTHY-602-3 ve ANKR-617-3) bu bölgeye spesifik 567 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir (Şekil 4. 25A). Bu bitkideki sistemik virüs enfeksiyonunun oluşumunda BNYVV'nin genom segmentlerinden RNA-1 ve RNA-2'ye ihtiyaç olduğu bildirilmesine rağmen (Tamada, 2016), beş örnekte ise (IGDR-6-3, GZNP-27-3, CNKL-150-3, KSTM-281-2 ve KYSR-524-1) BNYVV'nin RNA-2'si tarafından kodlanan CP bölgesi çoğaltılamamıştır (Şekil 4. 25A). Bununla birlikte, ELISA testi ile virüsün varlığı belirlenemeyen 10 örnekte, CP bölgesine spesifik primerlerin kullanımı ile yürütülen RT-PCR çalışması sonucu BNYVV tespit edilmiştir.

Ayrıca, 15 farklı BNYVV izolatu ile enfekteli *N. benthamiana* bitkilerinde, virüsün patojenitesi ve simptom oluşumunda etkili olan RNA-3 tarafından kodlanan P25 proteinin bulunma durumu, bu gene spesifik primerler kullanılarak (Acosta-Leal vd, 2008) (Çizelge 3. 3) tek aşamalı olarak uygulanan RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. PCR ürünlerinin jel görüntüleme cihazında incelenmesi sonucunda; sadece Ankara iline ait ANKR-617 izolatında (ANKR-617-3) bu bölgeye spesifik 1.015 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir. Ancak, *N. benthamiana* bitkilerinden elde edilen diğer BNYVV izolatları ile enfekteli *N. benthamiana* bitkilerinde virüs çoğalması esnasında, incelenen izolatların 14'ünde (% 93.3) BNYVV'nin RNA-3'ü tarafından kodlanan P25 protein bölgesi çoğaltılamamıştır (Şekil 4. 25B).

İlave olarak, yedi farklı BNYVV izolatu (IGDR-6-3, EDRN-125-2, BRSA-148-2, KSTM-281-2, ADPZ-291-3, KYSR-524-1 ve KTHY-602-3) ile enfekteli *N. benthamiana*'ya ait örneklerde, BNYVV'nin patojenitesinde rol oynayan ve RNA-5 üzerinde yer alan P26 proteini, gen spesifik primerler kullanılarak tek aşamalı RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Diğer sekiz izolatta ise, daha önce yürütülen çalışmalar ile RNA-5'in olmadığı bilindiğinden, RT-PCR çalışmalarına dahil edilmemiştir. Analiz edilen yedi izolatu, dördünde (IGDR-6-3, EDRN-125-2, KSTM-281-2 ve KTHY-602-3) bu bölgeye spesifik 885 bp büyüklüğünde zayıf bant oluşumu tespit edilmiştir (Şekil 4. 26)



Şekil 4.26. *N. benthamiana* bitkilerine inokule edilen BNYVV izolatlarında P26 geninin RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), -C: sağlıklı şeker pancarı (cv. Ansa) kök örneğinden elde edilen RNA, 6: Aralık-Iğdır, 125: Merkez-Edirne, 148: Yenişehir-Bursa, 281: Taşköprü-Kastamonu, 291: Erenler-Adapazarı, 524: Merkez-Kayseri, 602: Simav-Kütahya illerine ait inokule edilen *N. Benthamiana*'nın üst yapraklarından elde edilen RNA'lar]

Yürütülen bu çalışma sonucunda, farklı BNYVV izolatlarının *N. benthamiana* bitkilerine ilk aktarımını takiben, bu bitkinin üst yapraklarından izole edilen toplam RNA örneklerinde; BNYVV'nin genom segmentlerinden RNA-2 (CP), RNA-3 (P25), RNA-4 (P31) ve RNA-5 (P26)'in bulunma durumları toplu olarak Çizelge 4. 11'de sunulmuştur.

Çizelge 4.11. *Nicotiana benthamiana* bitkilerinden izole edilen BNYVV izolatlarında genom segmentlerinden RNA-2 (CP), RNA-3 (P25), RNA-4 (P31) ve RNA-5 (P26)'in bulunma durumları

GEN	BNYVV İZOLATLARI														
	IGDR-6-3	GZNP-27-3	ELZG-44-1	SMSN-61-2	TKAT-106-2	EDRN-125-2	KRLR-134-1	BRSA-148-2	CNKL-150-3	ESHR-225-1	KSTM-281-2	ADPZ-291-3	KYSR-524-1	KTHY-602-3	ANKR-617-3
CP	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
P25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
P31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P26	+	*	*	*	*	+	*	-	*	*	+	-	-	+	*

*Wild tip arazi izolatları BNYVV RNA-5'i içermemesi nedeniyle, bu örneklerde RNA-5'in bulunma durumu araştırılmamıştır.

4.7.3. BNYVV İzolatları ile İnokule Edilen *Nicotiana benthamiana* Bitkilerinde P31 Proteininin Baz ve Amino Asit Dizisi Analiz Sonuçları

Onbeş BNYVV izolatının *N. benthamiana* bitkilerine mekanik inokulasyonları sonrası, bu izolatların coğrafik orjinleri ve bitkilerde oluşturdukları belirtiler dikkate alınarak, bunlardan beşi (GZNP-44-1, BRSA148-2, CNKL-150-3, KYSR-524-1 ve ANKR-617-3) seçilmiştir. Elazığ ilinden elde edilen ELZG-44-1 izolatı ile inokule edilen bitkilerin üst yapraklarında kıvrılma, mozayik ve nekrotik leke; Bursa ili pancar üretim alanlarına ait BRSA-148-2 izolatı ile inokule edilen bitkilerde ise hafif cüceleşme ile birlikte, yapraklarda kıvrılma, mozayik ve nekrotik leke belirtileri gözlenmiştir. CNKL-150-3 (Çanakkale) ve KYSR-524-1 (Kayseri) izolatları ile enfekteli *N. benthamiana* bitkilerinde belirgin cüceleşme, yapraklarda kıvrılma, mozayik ve nekrotik leke tarzı belirtiler tespit edilmiştir. Bir diğer seçilen izolat olan ANKR-617-3 (Ankara) ile enfekteli bitkide ise cüceleşme, üst yapraklarda kıvrılma ve mozayik şeklinde belirtiler gözlenmiştir (Çizelge 4. 10). Daha sonra, seçilen bu izolatların P31 gen bölgeleri RT-PCR ile çoğaltılmış ve elde edilen PCR ürünleri sekans hizmeti veren bir firmaya (Genoks, Ankara) gönderilmiştir. Sekans analizi sonrasında 'Codon Code Aligner' programı kullanılarak BNYVV izolatlarının RNA-4'üne ait ileri ve geri yönde elde edilen ham sekans verileri hizalanmış ve konsensus diziler elde edilmiştir. Bu konsensus nükleotit dizilerinden izolatlara ait aa dizileri elde edilmiştir (EK-4).

Nicotiana benthamiana bitkilerinden elde edilen beş BNYVV izolatının RNA-4'ünün sekans analizi yapılan bölgenin uzunluğu yaklaşık 849 baz kadar olup P31 geninin tamamını içermektedir (EK-3). *N. benthamiana* ve tuzak bitki (şeker pancarı) köklerinden elde edilen BNYVV izolatlarının aralarındaki genetik benzerliklerin incelenmesi amacıyla NCBI'daki BLASTn algoritması kullanılmıştır. Bu çalışmada; tuzak bitki testi sonrası şeker pancarı köklerinden elde edilen BRSA-148 ve KYSR-524 izolatlarının dizileri, *N. benthamiana*'dan izole edilen BRSA-148-2 ve KYSR-524-1 izolatlarının dizileri ile nükleotit düzeyinde % 100 benzer oldukları belirlenmiştir. Ayrıca Şeker pancarı ELZG-44, CNKL-150 ve ANKR-617 izolatlarının dizileri ile *Nicotiana benthamiana* ELZG-44-1, CNKL-150-3 ve ANKR-617-3 izolatlarının dizilerinin nükleotit düzeyinde % 99.88 oranında benzer oldukları saptanmıştır (Çizelge 4. 12).

Çizelge 4.12. Şeker pancarı tuzak bitki kökleri (şeker pancarı) ve *N. benthamiana* bitkilerinin üst yapraklarından izole edilen BNYVV izolatlarının P31 proteinine göre nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları

İzolat Adı	İzole Edildiği Bitki	No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ELZG-44	Şeker pancarı	1	*	99.88	99.88	99.88	99.76	99.88	99.88	99.88	99.76	99.88
ELZG-44-1	<i>N. benthamiana</i>	2	99.88	*	100	100	99.88	100	100	100	99.88	100
BRSA-148	Şeker pancarı	3	99.88	100	*	100	99.88	100	100	100	99.88	100
BRSA-148-2	<i>N. benthamiana</i>	4	99.88	100	100	*	99.88	100	100	100	99.88	100
CNKL-150	Şeker pancarı	5	99.76	99.88	99.88	99.88	*	99.88	99.88	99.88	99.76	99.88
CNKL-150-3	<i>N. benthamiana</i>	6	99.88	100	100	100	99.88	*	100	100	99.88	100
KYSR-524	Şeker pancarı	7	99.88	100	100	100	99.88	100	*	100	99.88	100
KYSR-524-1	<i>N. benthamiana</i>	8	99.88	100	100	100	99.88	100	100	*	99.88	100
ANKR-617	Şeker pancarı	9	99.76	99.88	99.88	99.88	99.76	99.88	99.88	99.88	*	99.88
ANKR-617-3	<i>N. benthamiana</i>	10	99.88	100	100	100	99.88	100	100	100	99.88	*

Çizelge 4. 13 incelendiğinde; şeker pancarı köklerinden elde edilen ELZG-44 izolatında 592. pozisyonda yer alan Timin (T) yerine, *N. benthamiana*'dan izole edilen ELZG-44-1 izolatında Adenin (A) şeklinde tek nükleotide değişimin olduğu saptanmıştır. CNKL-150 izolatında ise 710. pozisyondaki T'in, CNKL-150-3'de A olarak değiştiği görülmüştür. ANKR-617 izolatında ise, 419. pozisyonda yer alan T yerine, ANKR-617-3 izolatında Sitozinin (C) bulunduğu tespit edilmiştir. BRSA-148 ve KYSR-524 izolatlarında ise gerek tuzak bitki köklerinden izole edilen örnekler ile gerekse bu izolatların *N. benthamiana*'ya aktarımından sonra elde edilen BRSA-148-2 ve KYSR-524-1'de P31 genine ait bölgedeki baz dizilerinde herhangi bir değişimin olmadığı saptanmıştır. Öte yandan, nükleotitlerdeki bu değişimin bitkilerde kayıt edilen semptom tipleri ile ilişkisinin olmadığı görülmüştür (Çizelge 4. 13).

Çizelge 4.13. Şeker pancarı tuzak bitki kökleri ve *N. benthamiana* bitkilerinin üst yapraklarından izole edilen BNYVV izolatlarının P31 gen bölgesinde farklılık belirlenen nükleotit pozisyonları

İzolat Adı	İzole Edildiği Bitki	İzole Edildiği Bitkide Oluşan Semptom*	Nükleotit Pozisyon Numarası		
			419	592	710
ELZG-44	Şeker pancarı	N	C	T	A
ELZG-44-1	<i>N. benthamiana</i>	YK, M, NL	C	A	A
BRSA-148	Şeker pancarı	N	C	A	A
BRSA-148-2	<i>N. benthamiana</i>	YK, M, NL	C	A	A
CNKL-150	Şeker pancarı	C, K	C	A	T
CNKL-150-3	<i>N. benthamiana</i>	YK, M, NL, HC	C	A	A
KYSR-524	Şeker pancarı	N	C	A	A
KYSR-524-1	<i>N. benthamiana</i>	YK, M, NL, C	C	A	A
ANKR-617	Şeker pancarı	N	T	A	A
ANKR-617-3	<i>N. benthamiana</i>	YK, M, C	C	A	A

*N: Normal Bitki Gelişimi, KL: Klorotik Leke, NL: Nekrotik Leke, B: Yapraklarda Bombe Oluşumu, C: Cüceleşme, HC: Hafif Cüceleşme

Bu izolatlarda aa yönünden değişim irdelendiğinde ise, yukarıda bahsedilen pozisyonlardaki nükleotitlerde oluşan değişim bu noktalarda yer alan aa'lerde de değişimin oluşmasına sebep olmuştur (EK-4; Çizelge 4. 14).

Çizelge 4.14. Şeker pancarı tuzak bitki kökleri ve *N. benthamiana* bitkilerinin üst yapraklarından izole edilen BNYVV izolatlarının P31 gen bölgesinde farklılık belirlenen amino asit pozisyonları

İzolat Adı	İzole Edildiği Bitki	İzole Edildiği Bitkide Oluşan Simptom*	Amino Asit Pozisyon Numarası		
			140	198	237
ELZG-44	Şeker pancarı	N	A	F	D
ELZG-44-1	<i>N. benthamiana</i>	YK, M, NL	A	I	D
BRSA-148	Şeker pancarı	N	A	I	D
BRSA-148-2	<i>N. benthamiana</i>	YK, M, NL	A	I	D
CNKL-150	Şeker pancarı	C, K	A	I	V
CNKL-150-3	<i>N. benthamiana</i>	YK, M, NL, HC	A	I	D
KYSR-524	Şeker pancarı	N	A	I	D
KYSR-524-1	<i>N. benthamiana</i>	YK, M, NL, C	A	I	D
ANKR-617	Şeker pancarı	N	V	I	D
ANKR-617-3	<i>N. benthamiana</i>	YK, M, C	A	I	D

*N: Normal Bitki Gelişimi, KL: Klorotik Leke, NL: Nekrotik Leke, B: Yapraklarda Bombe Oluşumu, C: Cüceleşme, HC: Hafif Cüceleşme

N. benthamiana ve tuzak bitki köklerinden elde edilen BNYVV izolatlarının aralarındaki genetik benzerliklerin araştırılması amacıyla NCBI'daki BLASTp analizi uygulanmıştır. Bu çalışmada; tuzak bitki köklerinden elde edilen BRSA-148, CNKL-150 ve KYSR-524 izolatlarının, *N. benthamiana*'dan izole edilen BRSA-148-2, CNKL-150-3 ve KYSR-524-1 izolatları ile aa bakımından % 100 benzer oldukları belirlenmiştir. ELZG-44 ve ANKR-617 izolatları ile ELZG-44-1 ve ANKR-617-3 izolatları ise bahsedildiği sıraya göre birbirleri ile aa bakımından % 99.65 oranında benzer oldukları saptanmıştır (Çizelge 4. 15).

Çizelge 4.15. Şeker pancarı tuzak bitki kökleri ve *N. benthamiana* bitkilerinin üst yapraklarından izole edilen BNYVV izolatlarının P31 proteinine göre amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları

İzolat Adı	İzole Edildiği Bitki	No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ELZG-44	Şeker pancarı	1	*	99.65	99.65	99.65	99.29	99.65	99.65	99.65	99.29	99.65
ELZG-44-1	<i>N. benthamiana</i>	2	99.65	*	100	100	99.65	100	100	100	99.65	100
BRSA-148	Şeker pancarı	3	99.65	100	*	100	99.65	100	100	100	99.65	100
BRSA-148-2	<i>N. benthamiana</i>	4	99.65	100	100	*	99.65	100	100	100	99.65	100
CNKL-150	Şeker pancarı	5	99.29	99.65	99.65	99.65	*	100	99.65	99.65	99.29	99.65
CNKL-150-3	<i>N. benthamiana</i>	6	99.65	100	100	100	100	*	100	100	99.65	100
KYSR-524	Şeker pancarı	7	99.65	100	100	100	99.65	100	*	100	99.65	100
KYSR-524-1	<i>N. benthamiana</i>	8	99.65	100	100	100	99.65	100	100	*	99.65	100
ANKR-617	Şeker pancarı	9	99.29	99.65	99.65	99.65	99.29	99.65	99.65	99.65	*	99.65
ANKR-617-3	<i>N. benthamiana</i>	10	99.65	100	100	100	99.65	100	100	100	99.65	*

4.7.4. *N. benthamiana*'dan elde edilen BNYVV İzolatlarının *N. benthamiana* Bitkilerine İkinci Aktarımı Sonucu Elde Edilen Bulgular

Onbeş BNYVV izolatının mekaniksel inokulasyon yöntemi ile *N. benthamiana* bitkilerine ilk aktarımını takiben 30 gün sonra, bu bitkilerin üst yapraklarının bir kısmı ayrılarak, ayrı ayrı etiketlenip -80°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Daha sonra, bu örnekler virüs inokulumu olarak kullanılarak, 2. kez *N. benthamiana* bitkilerine Yöntem 3.2.5'de belirtildiği şekilde virüs aktarımı gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, yeterli sayıda inokulasyona uygun bitki elde edilemediği için, her bir izolat için tek tekerrür uygulanabilmiştir. Virüs inokulasyonunu takiben bitkiler dört hafta süre ile izlenmiş ve bu sürede oluşan belirtiler kayıt edilmiştir (Çizelge 4. 16). Bu süre sonunda, her bir bitkide oluşan belirtilerin fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4. 27-Şekil 4. 41).

Farklı BNYVV izolatları ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinde oluşan sistemik belirtiler incelendiğinde; bu bitkilerin tamamının yapraklarında kıvrılma olduğu görülmüştür (Şekil 4. 27- Şekil 4. 41). Bu belirtiyeye ilave olarak, 10 BNYVV izolatı (IGDR-6-3, GZNP-27-3, ELZG-44-1, TKAT-106-2, EDRN-125-2, KRLR-134-1, BRSA-148-2, ESHR-225-1, KSTM-281-2 ve KYSR-524-1) ile inokule edilen bitkilerde ise cüceleşmenin de olduğu dikkat çekmiştir. Diğer beş örnekte (SMSN-61-2, CNKL-150-3, ADPZ-291-3, KTHY-602-3 ve ANKR-617-3) ise cüceleşme gözlenmemiştir. Hafif mozayik belirtisi ise sadece üç örnekte (SMSN-61-2, KSTM-281-2 ve ADPZ-291-3) tespit edilmiştir (Şekil 4. 27- Şekil 4. 41).

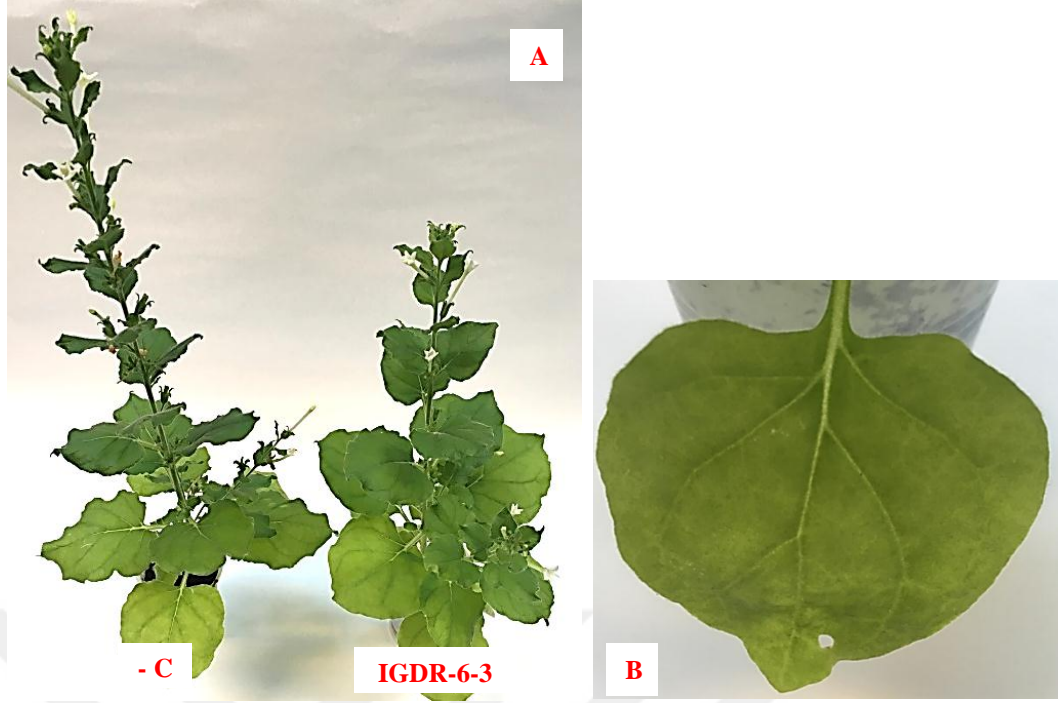
Daha sonra ise, bu bitkilerde oluşan belirtilerin BNYVV enfeksiyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını teyit etmek amacıyla bitkilerin virüs inokule edilen ve edilmeyen 1'er yaprağı alınarak, öncelikle ELISA yöntemi ile test edilmiştir (Çizelge 4. 16). Uygulanan ELISA testi sonucunda, 2. aktarım sonrası *N. benthamiana*'da BNYVV enfeksiyonu sadece GZNP-27-3 izolatı ile inokule edilen yaprakta ve ANKR-617-3 izolatı ile inokule edilen bitkinin üst yapraklarında tespit edilmiştir (Çizelge 4. 16).

Çizelge 4.16. *N. benthamiana*'dan elde edilen BNYVV izolatlarının *N. benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu test bitkilerinde gözlenen semptomlar ve ELISA testi sonuçları

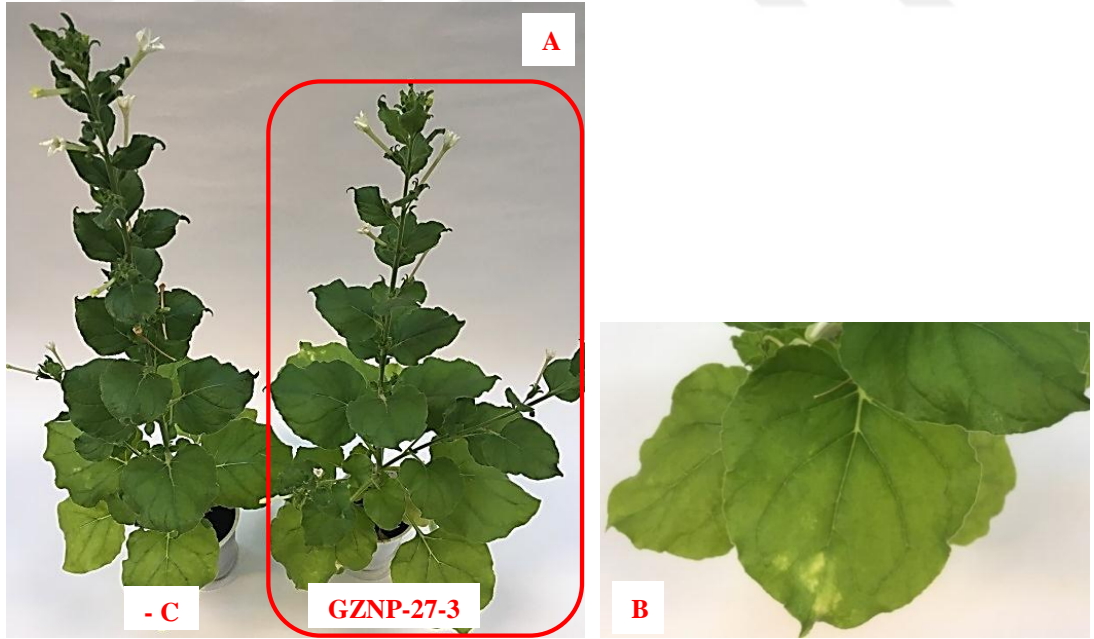
İzolat Adı	Virüs-inokuleli yaprak		Virüs-inokulasyonu yapılmayan üst yapraklar		Bitkinin Genel Görünümü*
	Semptom*	ELISA Absorbans Değeri**	Semptom*	ELISA Absorbans Değeri**	
IGDR-6-3	YK, YUDRA	0.168 (-)	YK	0.145 (-)	YK, C
GZNP-27-3	YK, YUİKLL	0.266 (+)	YK	0.093 (-)	YK, HC
ELZG-44-1	YK, YDB	0.090 (-)	YK	0.173 (-)	YK, AC
SMSN-61-1	YK, UKLL	0.089 (-)	YK, HM	0.087 (-)	YK, HM
TKAT-106-2	YK, KLL	0.117 (-)	YK	0.090 (-)	YK, AC
EDRN-125-2	YK	0.086 (-)	YK	0.101 (-)	YK, AC
KRLR-134-1	YK, KLL	0.086 (-)	YK	0.091 (-)	YK, C
BRSA-148-2	YK	0.095 (-)	YK	0.089 (-)	YK, C
CNKL-150-3	YK	0.088 (-)	YK	0.099 (-)	YK
ESHR-225-1	YK	0.087 (-)	YK	0.091 (-)	YK, HC
KSTM-281-2	YK, HM, DRA	0.103 (-)	YK, HM	0.090 (-)	C, HM
ADPZ-291-3	YK, HM, DB	0.087 (-)	YK, HM	0.097 (-)	YK, HM
KYSR-524-1	YK, İKLL	0.091 (-)	YK	0.094 (-)	YK, AC
KTHY-602-3	YK, HM	0.102 (-)	HK	0.084 (-)	YK
ANKR-617-3	YK, HM	0.108 (-)	YK	0.260 (+)	YK
-C (<i>N. benthamiana</i>)		0.101		0.101	N

* : YK: Yapraklarda Kıvrılma, YDB: Yaprak Damarlarında Belirginleşme, YUDRA: Yaprak Ucunda Damarlarda Renk Açılımı, YUİKLL: Yaprak Ucunda İri Klorotik Lokal Lezyon, UKLL: Ufak Klorotik Lokal Leke, HM: Hafif Mozayik, N: Normal Bitki Gelişimi, C: Cüceleşme, AC: Aşırı cüceleşme, HC: Hafif Cüceleşme

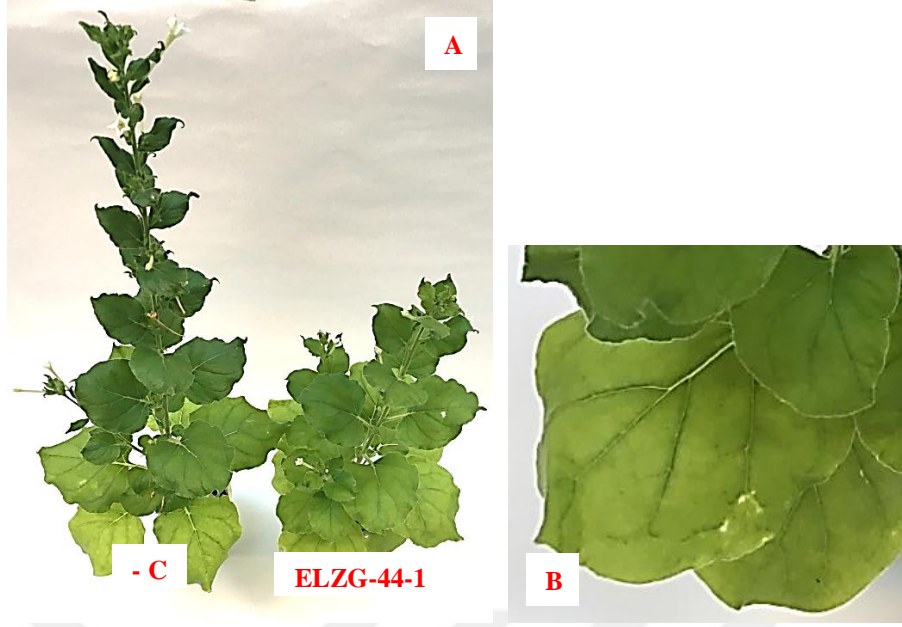
** : Mekanik inokulasyon sonrasında uygulanan ELISA testinde 2 h'lik substrat inkubasyonu sonucu elde edilen ELISA değeri ortalamaları; + = *N. benthamiana* negatif kontrolün 2 katından fazla olan ELISA absorbans değerleri



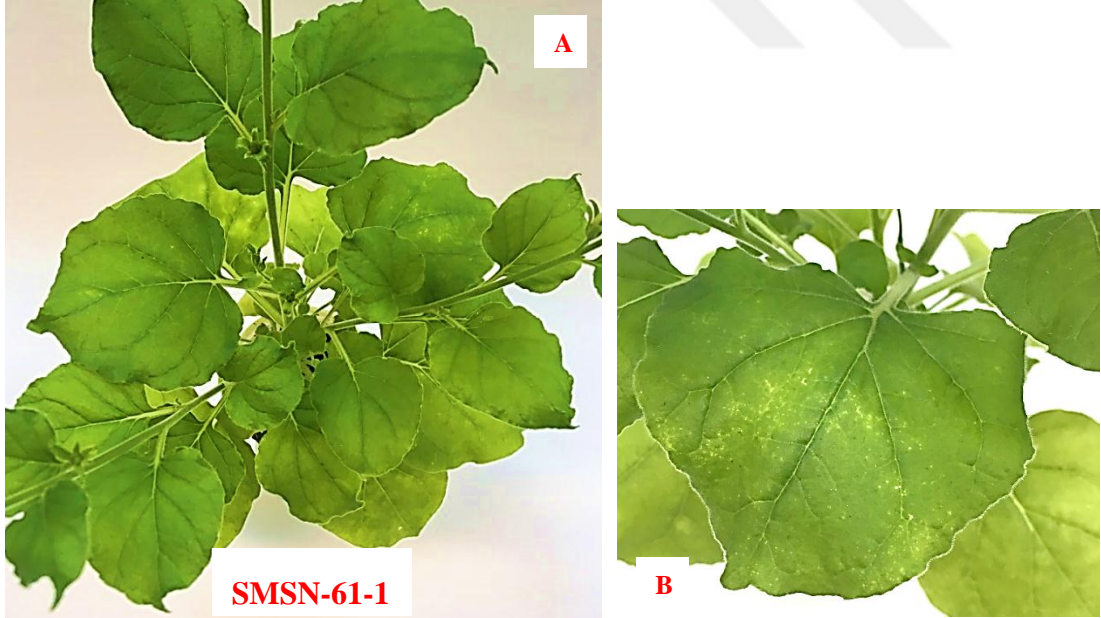
Şekil 4.27. IGDR-6-3 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucunda bu bitkide oluşan cüceleşme (A) ile virüs-inokule edilen yaprak ucunda oluşan damarda belirginleşme belirtilerinin görünümü (B)



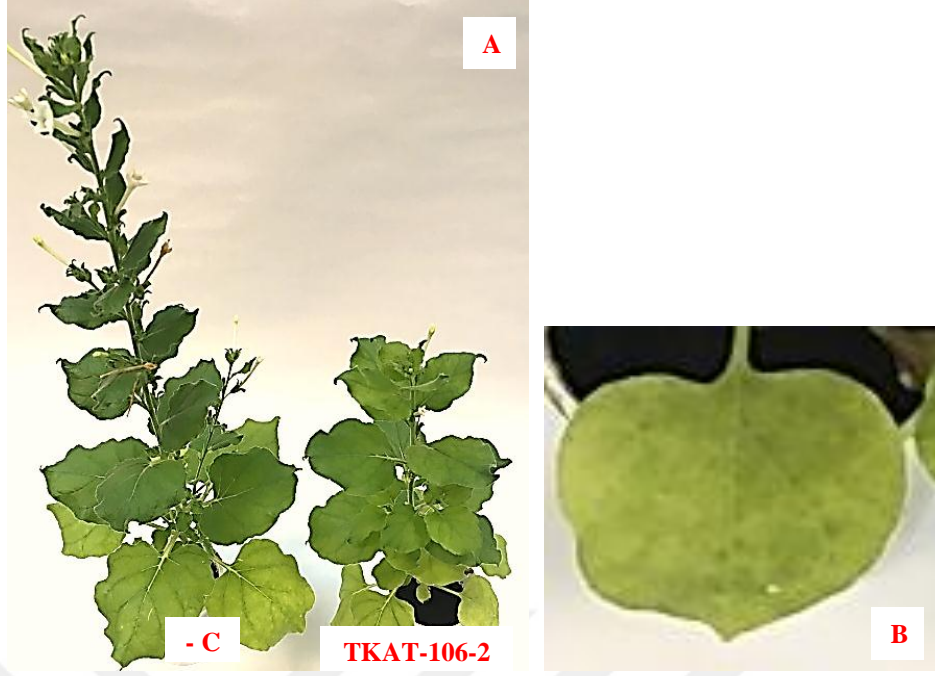
Şekil 4.28. GZNP-27-3 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucunda bu bitkide oluşan hafif cüceleşme (A) ile virüs-inokule edilen yapraklarda oluşan bombe ve yaprak ucunda oluşan iri klorotik lekelerin görünümü (B) (Kırmızı çerçeve içerisine bitki RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



Şekil 4.29. ELZG-44-1 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucunda bu bitkide oluşan belirgin cüceleşme (A) ile virüs-inokule edilen yapraklarda oluşan bombe ve yaprak damarlarında oluşan belirginleşme ve klorotik lekelerin görünümü (B)



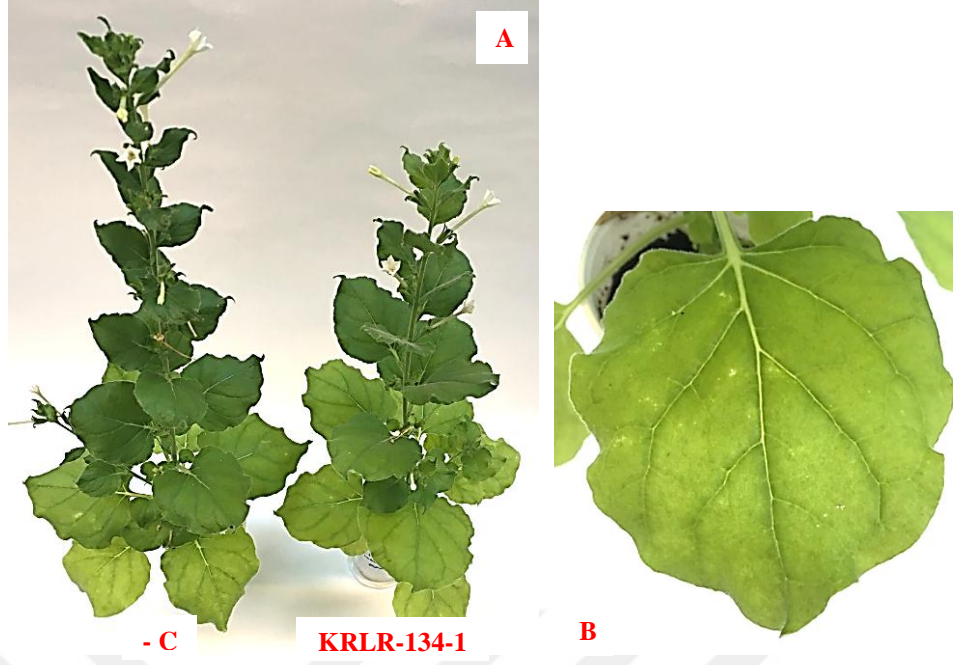
Şekil 4.30. SMSN 61-1 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkinin yapraklarında oluşan kıvrılma (A) ile bazı yapraklarda gözlenen klorotik lekeler (B)



Şekil 4.31. TKAT-106-2 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan belirgin cüceleşme (A) ile virüs-inokule edilen yapraklarda oluşan klorotik lekelerin görünümü (B)



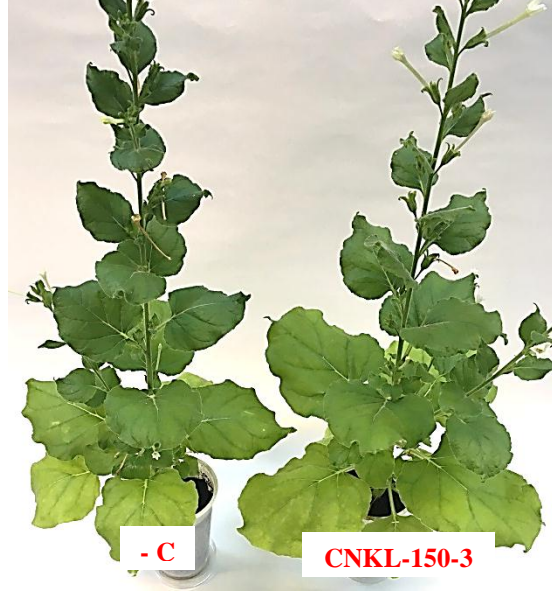
Şekil 4.32. EDRN-125-2 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan belirgin cüceleşme belirtisinin görünümü



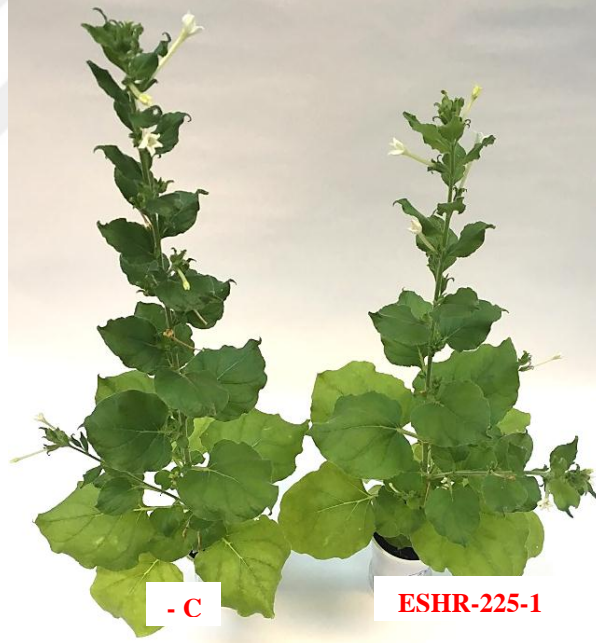
Şekil 4.33. KRLR-134-1 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan cüceleşme (A) ile virüs-inokule edilen yapraklarda oluşan klorotik lokal lezyonların görünümü (B)



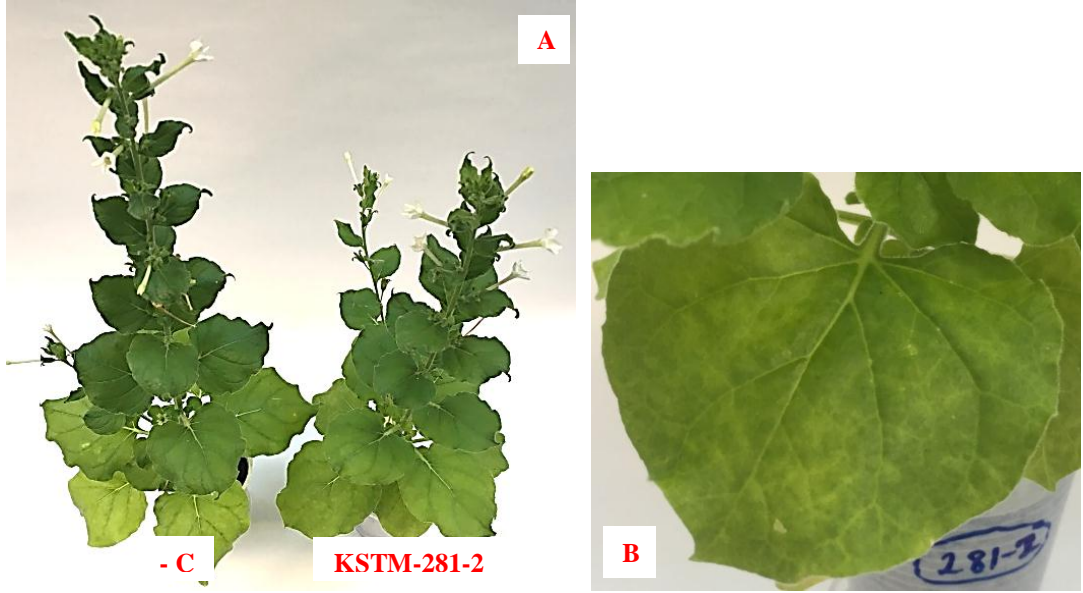
Şekil 4.34. BRSA-148-2 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan cüceleşmenin görünümü



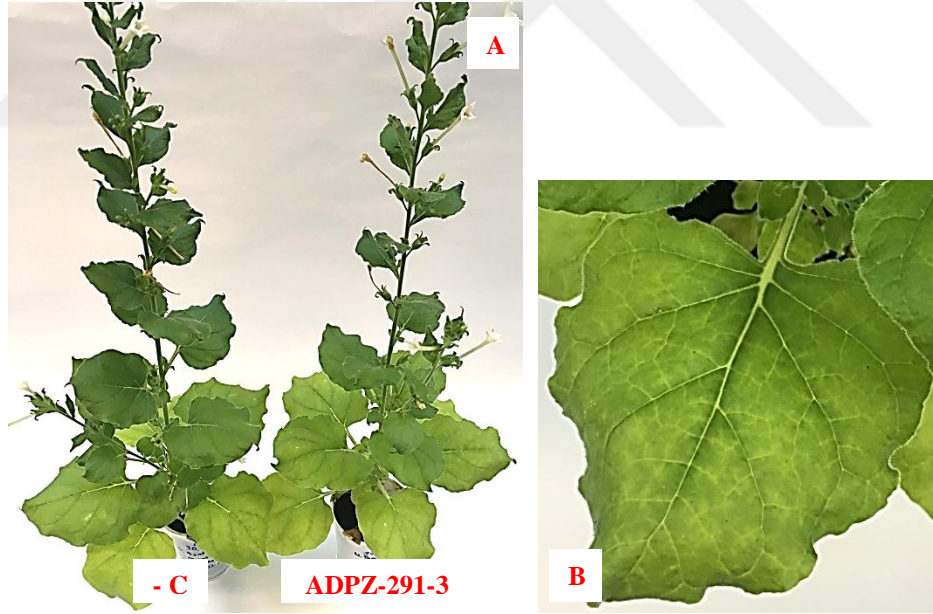
Şekil 4.35. CNKL-150-3 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkinin genel görünümü



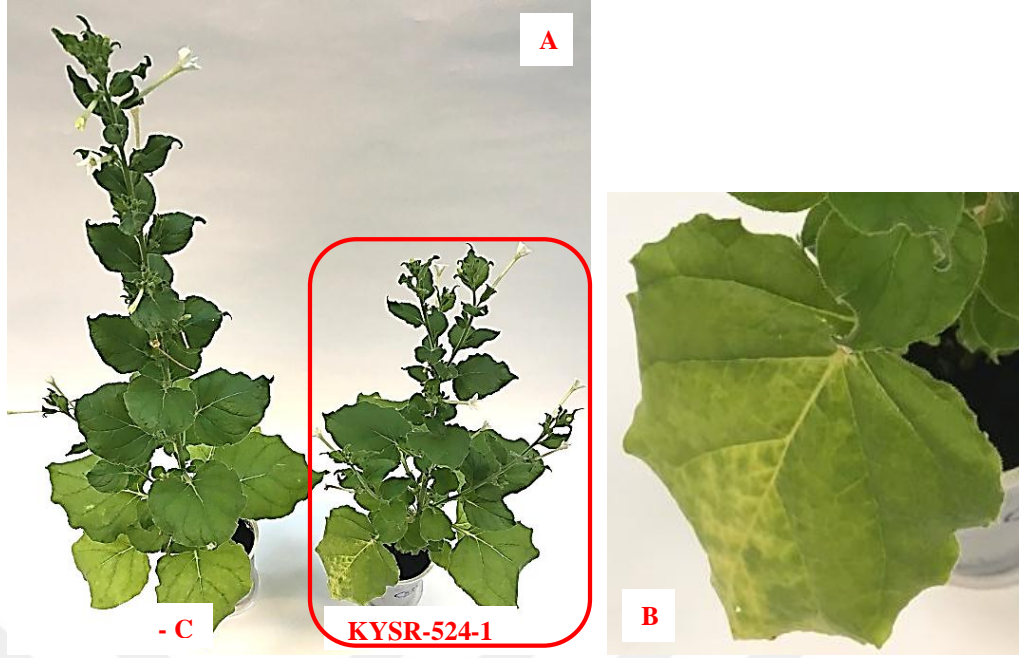
Şekil 4.36. ESHR-225-1 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan hafif cüceleşme belirtisinin görünümü



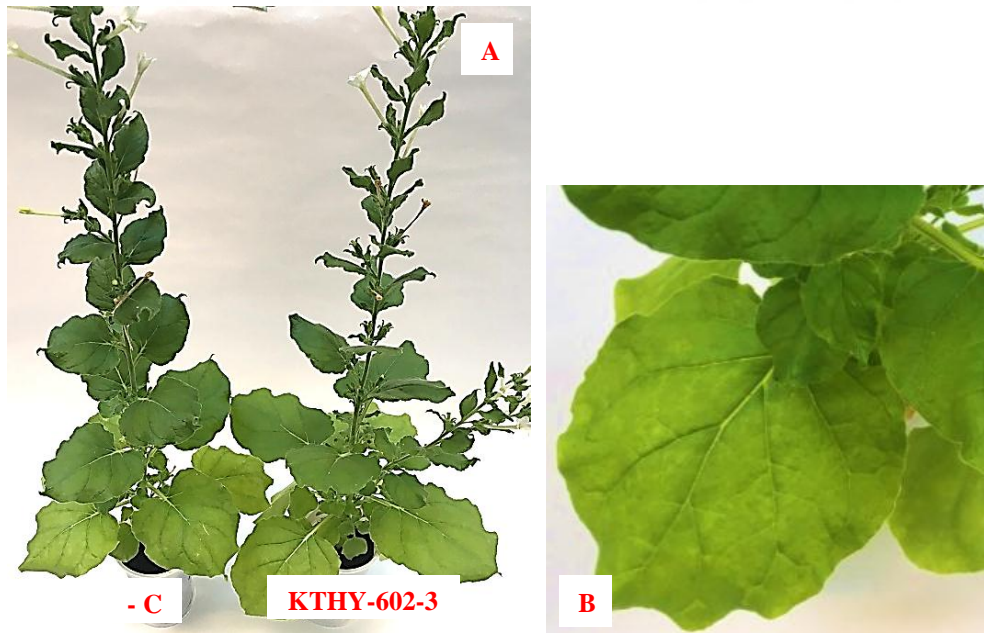
Şekil 4.37. KSTM-281-2 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan cüceleşme (A) ile virüs-inokulasyonu yapılmayan alt yapraklarda oluşan hafif mozaik ve damarlarda renk açılımı belirtisinin görünümü (B)



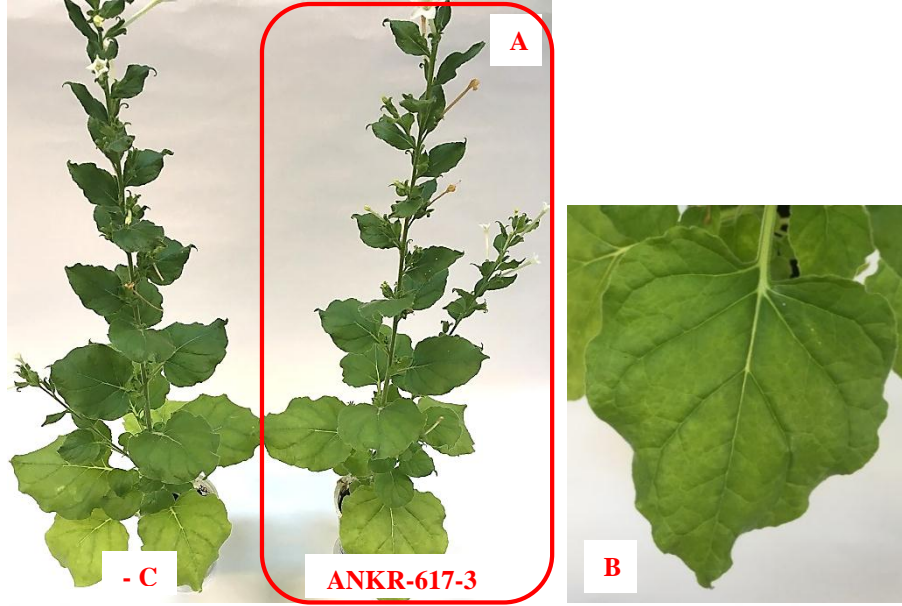
Şekil 4.38. ADPZ-291-3 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkinin genel görünümü (A) ile virüs-inokulasyonu yapılmayan alt yapraklarda oluşan belirgin kıvrılma, hafif mozaik ve damarlarda renk açılımı belirtisinin görünümü (B)



Şekil 4.39. KYSR-524-1 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkide oluşan belirgin cüceleşme (A) ile virüs-inokulasyonu yapılmayan alt yapraklarda oluşan belirgin içe bombe, damarlarda renk açılımı ve oluşan klorotik alanların görünümü (B) (Kırmızı çerçeve içerisine bitki RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)



Şekil 4.40. KTHY-602-3 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkinin genel görünümü (A) ile virüs-inokulasyonu yapılmayan alt yapraklarda oluşan hafif kloroz ve mozaik belirtisinin görünümü (B)



Şekil 4.41. ANKR-617-3 izolatının *Nicotiana benthamiana*'ya ikinci aktarımı sonucu bu bitkinin genel görünümü (A) ile virüs-inokulasyonu yapılmayan alt yapraklarda oluşan hafif kloroz ve bombe belirtisinin görünümü (B) (Kırmızı çerçeve içerisinde bitki RNA izolasyonu yapılan örneği ifade etmektedir)

BNYVV izolatlarının *N. benthamiana* bitkilerine I. ve II. aktarımı sonucunda oluşan belirtiler kıyaslandığında; I. aktarımı takiben incelenen örneklerin tamamında üst yapraklarda çarpıcı mozayik symptomunun oluşumu dikkat çekmesine rağmen, II. aktarım sonrasında ise genellikle incelenen örneklerin büyük bir kısmında belirgin bir cüceleşmenin olduğu görülmüştür. Bu bitkilere ait bitki boyu parametresi ile ilgili gözlem sonuçları kıyaslamalı olarak Çizelge 4. 17'de sunulmuştur. Buna göre; *N. benthamiana*'ya IGDR-6-3, ELZG-44-1, TKAT-106-2, EDRN-125-2 ve KSTM-281-2 izolatlarının ilk aktarımları sonrasında (1 ay sonra), sağlıklı kontrol ile kıyaslandığında bitki boylarında herhangi bir farklılığın olmadığı görülmüştür. Ancak, II. aktarımını takiben (1 ay sonra) *N. benthamiana* bitkilerinde belirgin bir cüceleşmenin olduğu saptanmıştır. SMSN-61-1, ADPZ-291-3 ve KTHY-602-3 izolatlarının ise her iki inokulasyonunda da *N. benthamiana* bitkilerinin boyunda bir değişim tespit edilmemiş, bitkiler sağlıklı kontrole benzer bir gelişim göstermişlerdir. KRKL-134-1, BRSA-148-2, ESHR-225-1 ve KYSR-524-1 izolatları ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkileri ise hem I. aktarım, hem de II. aktarım sonrası değişen oranlarda cücelik belirtisi sergilemişlerdir. Enteresan olarak, CNKL-150-3 ve ANKR-617-3 izolatları ile inokule edilenlerde ise, I. aktarım sonrası cüceleşme symptomu görülmesine rağmen, II. aktarımı takiben *N. benthamiana* bitkilerinin sağlıklı kontrole

benzer gelişim sergilediği görülmüş ve bu bitkilerde herhangi bir cüceleşmenin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4. 17).

Çizelge 4.17. BNYVV izolatlarının *N. benthamiana* bitkilerine I. ve II. aktarımları sonucu bitki boyunda gözlenen farklılıkların kıyaslanması

İzolot Adı	<i>N. benthamiana</i> Bitkilerinin Genel Görünümleri**	
	I. Aktarım	II. Aktarım
IGDR-6-3	N	C
GZNP-27-3*	N	HC
ELZG-44-1	N	AC
SMSN-61-1	N	N
TKAT-106-2	N	AC
EDRN-125-2	N	AC
KRLR-134-1	HC	C
BRSA-148-2	HC	C
CNKL-150-3	C	N
ESHR-225-1	HC	HC
KSTM-281-2	N	C
ADPZ-291-3	N	N
KYSR-524-1*	HC	AC
KTHY-602-3	N	N
ANKR-617-3*	C	N

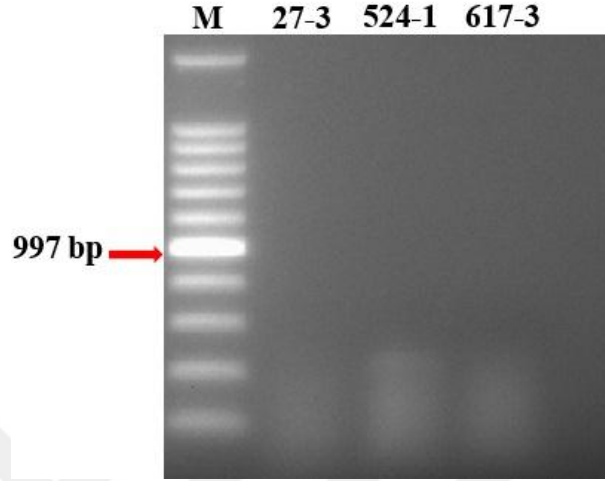
*: Moleküler çalışmalar için seçilen örnekleri ifade etmektedir.

** N: Normal Bitki Gelişimi, HC: Hafif Cüceleşme, C: Cüceleşme, AC: Aşırı Cüceleşme

4.7.4.1. *N. benthamiana*'dan elde edilen BNYVV İzolatlarının *N. benthamiana* Bitkilerine İkinci Aktarımı Sonucu Moleküler Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

Nicotiana benthamiana bitkilerine ikinci kez BNYVV izolatlarının aktarımı sonrasında, maliyetinin yüksek olması nedeniyle, RNA izolasyonu çalışmaları 15 örneğin tamamında gerçekleştirilememiştir. Örneklerin seçiminde; *N. benthamiana* bitkilerine her iki virüs aktarımı sonucunda bitki boyu parametresinde belirlenen farklılıklar (hafif cüceleşme, cüceleşme ve normal bitki gelişimi şeklinde) gözönüne alınmıştır (Çizelge 4. 17). Bu gruplandırmaya göre; sadece üç BNYVV izolatı (GZNP-27-3, KYSR-524-1 ve ANKR-617-3) ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkileri seçilmiş ve bu bitkilerin virüs inokulasyonu yapılmayan üst yaprakları alınarak, total RNA izolasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Takiben, bu izolatlarla ait P31 geninin çoğaltılması amacıyla RT-PCR çalışmaları, Superscript I One-Step RT-PCR System

with Platinum *Taq* DNA Polymerase kiti (Invitrogen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İncelenen üç örneğin hiçbirisinde P31 genine spesifik beklenen büyüklükte (977 bp) bant elde edilememiştir (Şekil 4. 42).



Şekil 4.42. P31 geninin RT-PCR yöntemi ile amplifikasyonu [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), 27-3:Gaziantep, 524-1: Kayseri, 617-3: Ankara illerine ait BNYVV izolatlarının inokulasyonu sonrası *N. benthamiana* bitkilerinin üst yapraklarından elde edilen RNA'lar]

4.7.5. BNYVV İzlatları ile İnokule Edilen *Spinacia oleraceae* ve *Beta vulgaris* Bitkileri ile Yürütülen Biyolojik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

Onbeş BNYVV izolatının; *Spinacia oleaceae*'nin iki çeşidi (cv. Rick Zwan ve cv. Nebraska) ve *Beta vulgaris* (cv. Ansa-BNYVV'ye hassas)'e mekanik olarak inokulasyonundan dört hafta sonra; bu bitkilerin üst yapraklarında bombeleşme, nekrotik leke, kloroz, cücelik ile virüs-inokule edilen alt yapraklarında ise kuruma şeklinde belirtiler gözlenmiştir (Çizelge 4. 18). Ancak, her iki türde de gözlenen bu belirtilere rağmen, uygulanan ELISA testi sonucunda; sadece BRSA-148 izolatı ile inokule edilen *S. oleraceae* cv. Rick Zwan bitkisinde BNYVV'nin ELISA absorbans değerinin pozitif olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4. 18; Şekil 4. 43).

Çizelge 4.18. BNYVV izolatların *S. oleraceae* ve *B. vulgaris* bitkilerinde oluşturduğu simptomlar ve ELISA testi sonuçları

İzolat Adı	<i>S. oleraceae</i>				<i>B. vulgaris</i>	
	cv. Rick Zwan		cv. Nebraska		cv. Ansa	
	Makroskobik Simptom*	ELISA Absorbans Değeri**	Makroskobik Simptom*	ELISA Absorbans Değeri**	Makroskobik Simptom*	ELISA Absorbans Değeri**
IGDR-6	B	0.336 (-)	NL, B	0.356 (-)	HK, B	0.330 (-)
GZNP-27	NL, B	0.366 (-)	NL, B	0.378 (-)	N, B	0.342 (-)
ELZG-44	NL, B	0.463 (-)	B	0.368 (-)	K, B	0.354 (-)
SMSN-61	NL, B	0.352 (-)	NL, B	0.316 (-)	B	0.327 (-)
TKAT-106	NL, B	0.445 (-)	NL, B	0.422 (-)	B	0.296 (-)
EDRN-125	K, B	0.396 (-)	NL, B	0.298 (-)	B	0.455 (-)
KRLR-134	NL, K, B	0.397 (-)	NL, B	0.523 (-)	K	0.374 (-)
BRSA-148	C, NL, B	3.593 (+)	NL, K, B	0.555 (-)	K, B	0.356 (-)
CNKL-150	NL, B	0.392 (-)	NL, B	0.502 (-)	K, B	0.339 (-)
ESHR-225	NL, B	0.452 (-)	M, BÖ	0.288 (-)	K, B	0.353 (-)
KSTM-281	HK, B	0.350 (-)	NL, B	0.311 (-)	K, B	0.355 (-)
ADPZ-291	HKL, B	0.319 (-)	HNL, B	0.404 (-)	HK	0.304 (-)
KYSR-524	NL, B	0.463 (-)	NL, B	0.355 (-)	K, B	0.352 (-)
KTHY-602	K, B	0.413 (-)	K, B	0.398 (-)	K, B	0.339 (-)
ANKR-617	K, B	0.382 (-)	K, B	0.340 (-)	B	0.328 (-)
-NK (Bioreba)		0.307		0.307		0.307

*: YK: Yaprakta kuruma, B: Bombeleşme, C: Cüceleşme, K: Kloroz, HK: Hafif kloroz, N: Nekroz, M: Mozaik, NL: Nekrotik leke, HNL: Hafif nekrotik leke, HKL: Hafif klorotik leke, BÖ: Bitki ölümü

** : Mekanik inokulsayondan bir ay sonra uygulanan ELISA testinde 2 h'lik substrat inkubasyonu sonucu elde edilen ELISA değeri ortalamaları; + = bioraba negatif kontrolün 2 katından daha fazla olan ELISA absorbans değerini; - : BNYVV negatif örnekleri ifade etmektedir



Şekil 4.43. BRS-148 izolatın mekanik inokulasyonundan 4 hafta sonra *S. oleraceae* cv. Rick Zwan bitkisinin üst yapraklarında oluşturduğu bombe (A) ile bazı üst yapraklarda gözlenen nekrotik lokal lekeler (B)

Sonuç olarak; uygulanan ELISA testi sonuçlarına göre, incelenen 15 BNYVV izolatının biri hariç (BRS-148 izolatı) sistemik konukçu olan ıspanakta, izolatların tamamının ise şeker pancarında sistemik enfeksiyon oluşturmadığı görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında; Türkiye'nin değişik lokasyonlarına ait şeker pancarı üretim alanlarından daha önceki bir çalışma ile elde edilmiş olan (Kutluk Yılmaz vd, 2016a), 15 farklı BNYVV izolatu kullanılarak, tuzak bitki testi sonrasında (cv. Ansa-rhizomania'ya hassas şeker pancarı) bu bitkilerin köklerinde BNYVV'nin vektörü *P. betae*'ya ait dinlenme spor yapılarının varlığı; hem mikroskopik ve hem de moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Bu çalışmada, kök boyaması çalışmalarını takiben, ışık mikroskop ile BNYVV'nin vektörü olan *P. betae*'ya ait dinlenme spor yapıları incelenen örneklerin tamamında tespit edilmiştir. Nitekim, 1990'ların başlarına kadar bu yöntem köklerde *P. betae*'nin tespiti için yaygın olarak kullanılmıştır (Peltier vd, 2008). Moleküler ve serolojik teknikler (DNA probları, PCR, nested PCR, ELISA) ise *P. betae*'nin köklerde, hatta toprakta hızlı bir şekilde tespitine olanak sağlamaktadır (Mutasa vd, 1996; Ward vd, 2005). Bu çalışmada, *Polymyxa betae*'ya spesifik primerler (Ward ve Adams, 1998) kullanılarak, daha hassas bir test olan RT-PCR çalışmaları ile de kök boyaması çalışması ile elde edilen sonuçlar teyit edilmiştir. Böylece, *Polymyxa betae*'ya spesifik primerler kullanılarak 15 örnekte beklenen büyüklükte bant (250 bp) elde edilmiştir. Ryasenek vd (2008), köklerde düşük sayıda sistosori (dinlenme spor yapısı) olması durumunda, *P. betae* tarafından oluşturulan enfeksiyondan emin olmak için, yapılan çalışmalarda PCR yönteminin kullanılmasının uygun olacağını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, gerek mikroskopik, gerekse RT-PCR yöntemi kullanılarak her iki yöntem ile de köklerde vektör *P. betae*'nin varlığı belirlenmiştir.

Son yıllarda yürütülen çalışmalar BNYVV'nin vektörle taşınmasında bazı viral proteinlerin özel rollerinin bulunduğunu ortaya koymuştur. BNYVV CP+RT (readthrough) bölgesinin taşınma sürecinin önemli bir kısmını oluşturduğu saptanmıştır. Nitekim, bu bölgenin C-terminal kısmında delesyon (silinme) oluşması durumunda virüsün vektörle taşınmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, RT bölgesinin 553.-556. pozisyonlarında yer alan aa'lerde KTER motifinin olması durumunda vektörle taşınmanın gerçekleştiği, ATAR motifi olduğunda ise taşınmanın bloke edildiği tespit edilmiştir (Tamada vd, 1996). BNYVV ile bulaşık toprak örneklerinde hassas şeker

pancarı ile yürütülen tuzak bitki testi sonrasında, bitki köklerine uygulanan ELISA testi ile incelenen örneklerin tamamında BNYVV enfeksiyonu saptanmıştır. Dolayısıyla, tüm örneklerde *in vitro* koşullarda BNYVV'nin vektör *P. betae* ile taşındığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan, BNYVV'nin vektörle etkili olarak taşınmasında RNA-4 üzerinde yer alan P31 proteinin de önemli rolü olduğu bildirilmektedir (Tamada ve Abe, 1989). Bu tez çalışmasında, P31 genine spesifik primerler ile gerçekleştirilen RT-PCR çalışmaları sonucunda; incelenen 15 tuzak bitki örneğinin, 10'unda P31 genine spesifik bant elde edilmiştir. Diğer beş örnekte ise RT-PCR çalışmaları tekrarlanmasına rağmen, P31 gen bölgesi çoğaltılamamıştır. Daha sonra, Iğdır (IGDR-6), Gaziantep (GZNP-27), Elazığ (ELZG-44), Samsun (SMSN-61), Edirne (EDRN-125), Bursa (BRSA-148), Kayseri (KYSR-524), Çanakkale (CNKL-150), Kastamonu (KSTM-281) ve Ankara (ANKR-617) illeri şeker pancarı üretim alanlarından elde edilen, 10 BNYVV izolatının P31 gen bölgesini içeren PCR ürünleri, sekans analizi hizmeti veren bir firmaya gönderilmiştir. Sekans analizi sonuçları Mega 7 (Kumar vd, 2016) ve Codon Code Aligner yazılımları kullanılarak düzenlenmiş ve her bir izolat için konsensus nükleotit dizileri elde edilmiştir. Sonrasında gerçekleştirilen BLASTn analizine göre; SMSN-61, EDRN-125, BRSA-148 ve KYSR-524 izolatlarının P31 genine göre nükleotit düzeyinde % 100 benzer oldukları belirlenmiştir. Diğer izolatların ise kendi aralarında nükleotit düzeyinde birbirleriyle yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (% 97.88-% 99.88) (Çizelge 4. 2). Bu izolatların P31 genom bölgesi Dünya izolatları ile BLASTn analizi ile nükleotit düzeyinde kıyaslandığında; Türkiye izolatlarının iki ayrı gruba ayrıldığı görülmüştür. İlk grupta yer alan IGDR-6 izolatının Kazakistan'a ait Kas2 ve Kas3 izolatlarıyla en yüksek genetik benzerliğe (% 99.76) sahip olduğu; ikinci grupta yer alan diğer izolatların ise en yüksek benzerliği İtalyan izolatları (IV4 ve I12) ile gösterdikleri belirlenmiştir (Çizelge 4. 4.).

BNYVV izolatlarının son taksonik gruplandırılması temel alınarak, NCBI'dan indirilen ve bu çalışmada elde edilen BNYVV izolatlarına ait P31 gen bölgesi sekans verileri kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. ML dendogramı incelendiğinde, GZNP-27, ELZG-44, SMSN-61, EDRN-125, BRSA-148, CNKL-150, KSTM-281, KYSR-524 ve ANKR-617 izolatlarının Grup III, IGDR-6 izolatının ise diğer izolatlardan farklı olarak Grup II içerisinde yer aldığı saptanmıştır (Şekil 4. 7). Nitekim, Grup II içerisinde Fransız-P ve Çin-B streynlerinin üyeleri bulunurken, Grup

III içerisinde ise İtalyan streyn grubuna dair BNYVV izolatlarının yer aldıkları Chiba vd (2011) tarafından bildirilmiştir. Böylelikle, bu çalışma ile ilk kez Türkiye BNYVV izolatlarının P31 genine göre dahil oldukları gruplar ortaya konulmuştur.

BNYVV nispeten dar bir konukçu çevresine sahip olmakla birlikte, *Chenopodiaceae* familyasına ait birçok bitki türüne ilave olarak, *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae* ve *Solanaceae* familyasından bazı bitki türlerine, bitki özsuyunun mekaniksel inokulasyonu yolu ile taşınabilmektedir (Tamada ve Baba, 1973; Kuszala ve Putz, 1977; Horvath, 1994; Hugo vd, 1996). Virüsün; *N. benthamiana*, *S. oleracea*, *Beta macrocarpa*, *Beta vulgaris* subsp. *maritima* M8 (Tamada, 1975; Tamada, 2002; Tamada, 2007) ve *Chenopodium murale* (Gilmer, 2016) gibi bazı konukçularında sistemik enfeksiyona neden olduğu belirtilmektedir.

Nicotiana benthamiana L., biber, domates, patates ve tütünü içeren, tarımsal açıdan önemli *Solanaceae* familyasına ait bir türdür (Bally vd, 2018). Genomu 19 kromozomdan oluşmakta olup, atasının *Nicotiana sylvestris* olduğu düşünülmektedir (Kelly vd, 2013). Bu tür, çok sayıda virüs tarafından enfekte edilebildiğinden, bitki virolojisinde en çok kullanılan deneysel konukçudur. Ek olarak, çok çeşitli bitki patojeni organizmalara (bakteri, oomycetes, fungus gibi) da hassas olduğu bilinmektedir. Özellikle; savunma sinyali ve doğuştan gelen immunité bağlamında konukçu-patojen araştırmalarının temel taşı olan bir türdür. Ayrıca, genetik olarak değiştirilebilir ve yeniden üretilebilir. Virüs kaynaklı gen susturma ve geçici gen ifadesi çalışmaları için uygun bir konukçudur. *N. benthamiana*, özellikle protein lokalizasyonu ve interaksiyonu ya da protein ifadesi (expression) için bitki bazlı sistemler gerektiren çalışmalarda, bitki biyolojisinde de hızla popülerlik kazanmıştır (Goodin vd, 2007). Ayrıca, son yıllarda *N. benthamiana*'nın taslak genom dizisinin ortaya konulması, bitki patojen etkileşimlerini araştırmak ve farklı bitki-patojen çiftleri arasındaki gen ekspresyonunu karşılaştırmak için model bitki olarak rolünü güçlendirmiştir (Goodin vd, 2008; Satoh vd, 2010).

Araştırmanın bu parçasında tez konusu çalışmaları içerisinde yer almamakla birlikte, öncelikle farklı coğrafik bölgelerden elde edilen 15 BNYVV izolatının *N. benthamiana* bitkilerine üç tekerrürlü olarak mekaniksel inokulasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu bitkilerde oluşan virüs benzeri belirtiler bir ay boyunca gözlenmiş ve kayıt edilmiştir. Bu çalışmada, *N. benthamiana* bitkilerinin virüs

inokulasyonu yapılmayan üst yapraklarında gözlenen en yaygın belirtiler; yapraklarda kıvrılma, mozaik ve nekrotik leke ile bitki boyunda kısılma şeklinde olmuştur. Nitekim, BNYVV'nin inokulasyonunu takiben 10-12 gün içerisinde, bu bitkinin üst yapraklarında aşağı doğru kıvrılma olduğu, enfekteli bitkilerin cüce kaldığı ve kıvrılan yaprakların zamanla solduğu bildirilmektedir (Andika vd, 2005). İnokulasyondan üç hafta sonra ise, yapraklarda şiddetli mozaik ile birlikte; şekil bozukluğunun da olduğu belirtilmekte olup, bu tip belirtiler 'şiddetli simptom' olarak adlandırılmaktadır. Diğer taraftan, bazen belirtilerin daha hafif seyrettiği ve bitkilerde cüceleşmenin olmadığı bildirilmekte olup, bu tarz oluşumlar ise 'hafif simptom' olarak değerlendirilmektedir (Rahim vd, 2007). Bu çalışmada, 15 farklı BNYVV izolatının inokule edildiği *N. benthamiana*'ya ait incelenen 45 bitkinin neredeyse tamamında yapraklarda mozaik tarzı belirtiler gözlenmiştir. Bununla birlikte; cüceleşme belirtisi sadece KYSR-524 izolatı ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinin tekerrürlerinin tamamında belirlenmiştir. Ayrıca, bu belirti bazı izolatlar (GZNP-27, KRLR-134, BRSA-148, CNKL-150, ESHR-225 ve ANKR-617) ile inokule edilen bitkilerin yalnızca bir ya da birkaç tekerrüründe gözlenmiştir. IGDR-6, ELZG-44, SMSN-61, TKAT-106, EDRN-125, KSTM-281, ADPZ-291 ve KTHY-602 izolatları ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinde ise tekerrürlerinin hiçbirisinde cüceleşme belirtisi kayıt edilmemiştir. Bu bitkide oluşan BNYVV tarzı belirtilerin virüs enfeksiyonundan kaynaklandığının teyit edilmesi amacıyla, bitkinin üst yapraklarına uygulanan ELISA testi sonucunda, sadece GZNP-27 izolatı ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinin 2. tekerrüründe BNYVV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Diğer örneklerde ise, elde edilen ELISA absorbans değerleri pozitif sınır olarak belirlenen negatif kontrolün iki katı ya da daha yüksek değere ulaşmamış ve bu sebeple bu örneklerde ELISA yöntemi ile BNYVV enfeksiyonu tespit edilememiştir. Serolojik yöntemlerden biri olan ELISA testinde tanılama, virüslerin nükleik asitlerini çevreleyen kılıf ya da membran proteinlerine ve onların özelliklerine dayalı olarak yapılmaktadır (Erkan vd, 2011). Çalışmamızda, *N. benthamiana* bitkilerinde ELISA ile virüsün tespit edilememesi nedeninin, bu bitkide viral CP'nin konsantrasyonunun düşük olmasından kaynaklanmış olabilir. Diğer taraftan, yürütülen bir araştırmada, bitki ubiquitinilasyonunun (ubiquitinylation), CP-spesifik antikorlar tarafından TMV'nin CP'i üzerindeki önemli epitoplara immüno tespitini önlediği bulunmuştur (Hamacher vd, 2003). Bu çalışmada da, *N. benthamiana* bitkilerinde

belirgin BNYVV tarzı simptomlar görülmesine rağmen, bitkide BNYVV CP'nin ELISA testi ile saptanamamasının, bu durumdan da kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Nitekim, yürütülen çalışmada daha sonra, maliyetinin yüksek olması nedeniyle, bu izolatlarla ait tekerrürlere birer tanesi seçilerek, 15 farklı BNYVV izolatu ile enfekteli *N. benthamiana* bitkilerinin virüs inokulasyonu yapılmayan üst yapraklarından RNA izolasyonu yapılmıştır. Takiben, CP'e spesifik primer kullanılarak yürütülen RT-PCR çalışmaları sonucunda incelenen örneklerin 10'ununda bu bölgeye spesifik büyüklükte zayıf bant elde edilebilmiştir (Şekil 4. 25).

Çeşitli araştırmacılar tarafından, *N. benthamiana* ve *S. oleracea* gibi sistemik konukçularında vasküler taşınma ve lokal lezyon konukçularında virüsün replikasyonu için BNYVV'nin genom segmentlerinden sadece RNA-1 ve RNA-2'sinin gerekli ve yeterli olduğu belirtilmektedir (Lauber vd, 1998a; Lauber vd, 1998b; Andika vd, 2005; Gilmer, 2016). Bununla birlikte, Plasmodiophorid vektörler tarafından taşınan bitki virüsleri, laboratuvarında tekrarlanan mekanik inokulasyonlarda; genomlarının bazı parçalarını kaybedebilmektedirler. Özellikle; *Benyvirus*, *Furovirus* ve *Pomovirus* cinslerinde yer alan virüs türlerinde RNA-2 tarafından kodlanan CP+Readthrough (RT) bölgesinin silinmelere meyilli olduğu bildirilmektedir. Bu silinmelerin *Potato mop top virus* (PMTV) ve BNYVV'nin vektörle taşınmasını etkilediği deneysel olarak gösterilmiştir (Adams vd, 2001). Benzer delesyonlar *Beet soil-borne virus* (BSBV) (Koenig vd, 1997) ve *Beet virus Q* (BVQ) (Koenig vd, 1998)'nun RT bölgelerinde de gözlenmiştir. Nitekim, bu çalışmada, mekanik olarak *N. benthamiana*'ya 15 BNYVV izolatu aktarımı sonrasında, RT-PCR ile analiz edilen Türkiye izolatlarında BNYVV RNA-2'si üzerinde yer alan CP bölgesi, sadece 10 izolatta tespit edilebilmiştir (Şekil 4. 25). İncelenen diğer beş örnekte (IGDR-6-3, GZNP-27-3, CNKL-150-3, KSTM-281-2 ve KYSR-524-1) ise, BNYVV CP'nin RT-PCR çalışmaları ile de belirlenememesi, *N. benthamiana* örneklerinin tamamında BNYVV CP'nin tespit edildiğini bildiren Rahim vd (2007) ve Wang vd (2011)'nin bulguları ile uyuşmamaktadır. Bununla birlikte, RNA-2 tarafından kodlanan p75 proteininin (CP+RT) vektörle taşınma için mutlaka gerekli olduğu bildirilmektedir (Tamada vd, 1996). Bu çalışmada virüs izolatları mekanik olarak *N. benthamiana* bitkilerine taşındığından, bu durum virüsün ilk aktarımını takiben bir aylık periyot süresince viral CP'nin sentezine ihtiyaç duymaması nedeni ile, CP bölgesinin silinmesinden kaynaklanmış olabilir. Bu durumun net olarak ortaya konulabilmesi için, BNYVV

CP'inin tespit edilemediği beş izolata ait diğer tekerrürlerde de RT-PCR çalışmalarının yürütülerek, elde edilen sonuçların teyit edilmesi gerekmektedir.

Nicotiana benthamiana bitkilerinde oluşan yapraklarda şiddetli mozayik, kıvrılma ve bitkide cüceleşme şeklindeki şiddetli simptomların BNYVV RNA-4'ü tarafından kodlanan P31 proteini ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Rahim vd, 2007; Wang vd, 2011). Önceki çalışmalarla uyumlu olarak (Rahim vd, 2007; Wang vd, 2011), bu çalışmada da, P31 genine spesifik primer kullanılarak yürütülen RT-PCR çalışmaları sonucunda 15 farklı BNYVV izolatu ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinin tamamında, P31 geninin varlığı belirlenmiştir. Bu sebeple, yürütülen çalışmada *N. benthamiana* bitkilerinde gözlenen simptomların BNYVV enfeksiyonu sonucu oluştuğu ve bu simptomların P31 geni ile ilişkili olduğu kanaatine varılmıştır. Bir diğer araştırmada ise, BNYVV O11 izolatu (RNA-1, RNA-2, RNA-3 ve RNA-4 segmentlerini içeren) ile inokule edilen 18 *N. benthamiana* bitkisinin, şiddetli simptom sergileyen 14'ünde wild tip RNA-4'ün bulunduğu; zayıf simptom sergileyen dört bitkide ise wild tip RNA-4'ün tespit edilemediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, zayıf simptom gözlenen dört örneğin birinde ise, wild tip RNA-4'e spesifik beklenen 997 bp'de bant oluşumu yerine, 997 bp'den biraz daha küçük bir bant oluşumu gözlenmesinden dolayı RNA-4'ün delesyonlu bir formunun bulunduğunu belirtilmiştir (Rahim vd, 2011). Diğer taraftan, *N. benthamiana*'da şiddetli simptom oluşumuna neden olan (yapraklarda kıvrılma+ cüceleşme) Çin izolatu BN345 (RNA-1, RNA-2, RNA-3, RNA-4 ve RNA-5 segmentlerini içeren) ile yürütülen bir diğer araştırmada ise, mekanik inokulasyon yapılan 25 bitkide RNA-4'ün bulunduğu, bu örneklerin bir tanesinde ise jelde oluşan bant profiline göre RNA-4'ün delesyonlu formunun olduğu bildirilmiştir (Wang vd, 2011). Yürütülen bu çalışmada; yedi BNYVV izolatu (IGDR-6-3, GZNP-27-3, ELZG-44-1, SMSN-61-2, TKAT-106-2, KSTM-281-2 ve KTHY-602-3) ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinde zayıf simptom oluşumu (sadece mozayik); diğer sekiz BNYVV izolatu (EDRN-125-2, KRLR-134-1, BRSA-148-2, CNKL-150-3, ESHR-225-1, ADPZ-291-3, KYSR-524-1 ve ANKR-617-3) ile inokule edilen bitkilerde ise şiddetli simptom (mozayik+cüceleşme) oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4. 25). Bu çalışmada incelenen örneklerin tamamında P31 proteininin varlığı tespit edilmiş olup, simptom tipleri (zayıf veya şiddetli) ile P31'in bulunma durumu arasında doğrudan bir ilişkinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Diğer taraftan, önceki çalışmalara benzer şekilde

(Rahim vd, 2007; Wang vd, 2011), bu çalışmada da, beş farklı BNYVV izolatu (KRLR-134-1, ESHR-225-1, KTHY-602-3, ADPZ-291-3 ve ANKR-617-3) ile inokule edilen *N. benthamiana* örneklerinde, 997 bp'de P31 genine spesifik oluşan bant ile birlikte daha küçük ekstra bir bant oluşumu da dikkat çekmiştir (Şekil 4. 25). Jelde oluşan bant profilleri incelendiğinde ise; KRLR-134-1, ESHR-225-1 ve KTHY-602-3 izolatları ile inokule edilen örneklerde oluşan ekstra bant büyüklüğünün birbirleri ile benzer olduğu görülmüştür. Diğer taraftan; ADPZ-291-3 ve ANKR-617-3 izolatları ile inokule edilen örneklerde de tespit edilen ekstra bantın diğer üç örnekten farklı büyüklükte olmakla birlikte, bu iki örnekte birbirine yakın büyüklükte olduğu saptanmıştır (Şekil 4. 25). Elde edilen bu sonuç, *N. benthamiana* bitkisine BNYVV'nin mekanik olarak ilk aktarımı sonucunda, bu beş örnekte P31 gen bölgesinde delesyon olabileceğini düşündürmüştür. Bu durumun net olarak ortaya konulabilmesi için, ileride bu ekstra bantlara ait PCR ürünlerinin elde edilerek, sekans analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, *N. benthamiana*'dan izole edilen örneklerde BNYVV RNA-3'ü tarafından kodlanan P25 proteininin bulunma durumu da araştırılmıştır. P25 bölgesine spesifik primerler ile yürütülen RT-PCR çalışmaları sonrasında incelenen örneklerden sadece birinde (ANKR-617-3) bu bölgeye spesifik bant elde edilmiştir. Bu bitkide rapor edilen semptom; mozayik+cüceleşme şeklinde olup bu tarz belirtiler 'şiddetli semptom' olarak ifade edilmektedir. Benzer belirtilere sahip diğer izolatlar ile enfekteli *N. benthamiana* örneklerinde (EDRN-125-2, KRLR-134-1, BRSA-148-2, CNKL-150-3, ESHR-225-1, ADPZ-291-3 ve KYSR-524-1) ise P25 geni tespit edilememiştir (Şekil 4. 25). Elde edilen bu sonuç, *N. benthamiana*'da gözlenen farklı semptom tipleri (zayıf veya şiddetli) ile P25'in bulunma durumu arasında bir ilişkinin olmadığını ve P25 bölgesinin *N. benthamiana*'da virüs çoğalması esnasında kendiliğinden elemine olabileceğini göstermiştir. Nitekim, Japon O11 BNYVV izolatının RNA-3 segmentinin *N. benthamiana* bitkilerinde genellikle kendiliğinden silindiği belirlenmiştir. Üstelik, RNA-3'ün *N. benthamiana* bitkilerinde şiddetli semptom oluşumu ile bir ilgisinin olmadığı da bildirilmiştir (Rahim vd, 2007). Halbuki, RNA-3 tarafından kodlanan P25 proteini doğal konukçularda klasik rhizomania semptomlarının oluşumu için gereklidir (Chiba vd, 2011). Ayrıca, *Tetragonia expansa* gibi farklı lokal lezyon konukçularında ve doğal konukçusu olan *Beta* türlerinde şiddetli sarı lokal lezyon oluşumundan sorumludur (Tamada vd, 1989; Tamada vd,

1999; Jupin vd, 1992). RNA-3 üzerinde yer alan bir diğer protein olan, N proteini ise nekrotik simptom oluşumunda etkili olmaktadır (Chiba vd, 2008; Jupin vd, 1992). RNA-3'ün core (çekirdek) bölgesi (1033 nt.-1257 nt.'leri arasındaki bölge) ise *B. macrocarpa*'da BNYVV'nin vasküler taşınmasında rol oynamaktadır (Lauber vd, 1998b). P31 ve P25 proteinlerinden her ikisi de simptom oluşumunda görev almakla birlikte; bu proteinlerin etkilerinin konukçuya spesifik ve farklı şekilde olduğu bildirilmiştir (Rahim vd, 2007).

İlave olarak, *N. benthamiana* bitkilerinden elde edilen örneklerden yedisinde (IGDR-6-3, EDRN-125-2, BRSA-148-2, KSTM-281-2, ADPZ-291-3, KYSR-524-1 ve KTHY-602-3), BNYVV'nin patojenitesinde rol oynayan ve RNA-5 üzerinde yer alan P26 proteini de, gen spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ile araştırılmıştır. Diğer sekizi ise, daha önce yürütülen çalışmalarda şeker pancarlarından izole edilen bu örneklerde RNA-5'in bulunmadığı bilindiğinden, RT-PCR çalışmalarına dahil edilmemiştir. Analiz edilen yedi örneğin, dördünde (IGDR-6-3, EDRN-125-2, KSTM-281-2 ve KTHY-602-3) bu bölgeye spesifik zayıf bant oluşumu saptanmıştır (Şekil 4. 26). Wang vd (2011), *N. benthamiana*'da şiddetli simptom oluşumuna neden olan (yapraklarda kıvrılma+ cüceleşme) BN345 izolatu (RNA-1, RNA-2, RNA-3, RNA-4 ve RNA-5 segmentlerini içeren) ile yürüttükleri çalışmada, virüsün mekanik inokulasyonunu takiben BNYVV ile enfekteli 25 bitkiden, sadece ikisinde RNA-5'in bulunduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, BNYVV ile enfekteli *N. benthamiana*'da RNA-5'in hareket ve replikasyonun çok düşük seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, RNA-3 ve RNA-4'ün birlikte enfeksiyonunda RNA-5'in sistemik hareketini engelleme olasılığını ortadan kaldırmak için, sadece RNA-1, RNA-2 ve RNA-5 segmentlerini içeren mutant BNYVV izolatını *N. benthamiana* bitkilerine inokule etmişler ve sonrasında gerçekleştirdikleri RT-PCR çalışmaları ile RNA-5'in sadece virüs inokule edilen yapraklarda mevcut olduğunu bildirmişlerdir (Wang vd, 2011). Diğer taraftan, bu araştırmacılar aynı çalışmada; RNA-1 + RNA-2 + RNA-3 + RNA-4 ya da RNA-1 + RNA-2 segmentlerini içeren BNYVV örneklerinde RNA-5'in üst yapraklarda saptandığını rapor etmişlerdir (Wang vd, 2011). Yürütülen bu araştırma sonucunda; simptom tiplerine göre bir ayırım olmaksızın, zayıf (IGDR-6-3, KSTM-281-2 ve KTHY-602-3) ya da şiddetli simptom (ESHR-225-1) sergileyen *N. benthamiana* bitkilerinin üst yapraklarına ait örneklerde RNA-5'in bulunduğu tespit edilmiştir. Diğer bazı konukçularında BNYVV'nin patojenitesini arttırdığı bildirilen

RNA-5'in (Liu vd, 2003; Link vd, 2005), *N. benthamiana*'da bu yönde ilave bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.

Ayrıca, bu çalışmada, 15 farklı BNYVV izolatu ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinin inokulasyondan yaklaşık bir ay sonra üst yaprakları alınarak, tekrar *N. benthamiana* bitkilerine inokulasyonları gerçekleştirilmiştir. BNYVV izolatlarının *N. benthamiana* bitkilerine I. ve II. aktarımı sonucunda oluşan belirtiler kıyaslandığında; I. aktarımı takiben incelenen örneklerin tamamında üst yapraklarda çarpıcı mozayik belirtinin oluşumu dikkat çekmesine rağmen, II. aktarım sonrasında ise genellikle incelenen örneklerin büyük bir kısmında belirgin bir küçülmeye olduğu görülmüştür (Çizelge 4. 17). Daha sonra; *N. benthamiana* bitkilerine her iki virüs aktarımı sonucunda bitki boyu parametresinde belirlenen farklılıklar (hafif küçülme, küçülme ve normal bitki gelişimi şeklinde) göz önüne alınarak, üç BNYVV izolatu (GZNP-27-3, KYSR-524-1 ve ANKR-617-3) ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkileri seçilmiş ve bu bitkilerin virüs inokulasyonu yapılmayan üst yaprakları alınarak, total RNA izolasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Takiben, bu örneklerde P31 geninin çoğaltılması amacıyla RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ancak, incelenen örneklerin hiçbirisinde P31 geni çoğaltılamamıştır. Bu sebeple, ileride incelenen örnek sayısının artırılarak bu çalışmaya devam edilmesi gerekmektedir.

Diğer taraftan, ELISA testi sonuçlarına göre, incelenen 15 BNYVV izolatu, biri hariç (BRSA-148 izolatu) sistemik konukçu olan ıspanakta, 15 izolatu tamamının ise şeker pancarında sistemik enfeksiyon oluşturmadığı görülmüştür. Nitekim, RNA-3 tarafından sentezlenen P25 proteini doğal konukçusu olan *Beta* türlerinde şiddetli sarı lokal lezyon oluşumundan sorumludur (Tamada vd, 1989; Tamada vd, 1999; Jupin vd, 1992). RNA-3 üzerinde yer alan bir diğer protein olan, N proteini ise nekrotik belirtiler oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir (Chiba vd, 2008; Jupin vd, 1992). *S. oleracea*'da ise vasküler taşınma için BNYVV'nin genom segmentlerinden sadece RNA-1 ve RNA-2'sinin yeterli olduğu belirtilmektedir (Lauber vd, 1998a; Lauber vd, 1998b; Andika vd, 2005; Gilmer, 2016). Bu sebeple, ıspanak ve pancar gibi sistemik konukçularda BNYVV enfeksiyonunun net olarak ortaya konulabilmesi için, bu bitkilere ait örneklerde ilgili genom bölgeleri göz önüne alınarak RT-PCR çalışmalarının yapılmasının gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Şeker pancarında rhizomania hastalığına *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) neden olmakta ve virüs vektör protozoa *Polymyxa betae* Keskin tarafından taşınmaktadır. Rhizomania hastalığının şeker pancarının verim ve kalitesinde büyük kayıplara neden olduğu bildirilmektedir. Bu hastalık ile mücadelede; öncelikle gerek etmenin, gerekse vektörünün doğru olarak tanınması büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, Türkiye şeker pancarı üretim alanlarından coğrafik lokasyonuna göre seçilen BNYVV ile bulaşık 15 toprak örneğinde, yürütülen tuzak bitki testi (cv. Ansa-rhizomania'ya hassas şeker pancarı) çalışmaları ile elde edilen kök örneklerinde; BNYVV'nin vektörü *P. betae*'ya ait dinlenme spor yapılarının varlığı; hem mikroskopik ve hem de moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda; BNYVV'ye hassas olan şeker pancarı bitkilerinin köklerinde, RT-PCR çalışmalarına gerek duyulmaksızın, direkt kök boyaması çalışmalarını takiben ışık mikroskobu ile vektörün dinlenme spor yapılarının kolaylıkla belirlenebildiği görülmüştür. Yürütülen moleküler çalışmalar sonucunda, 10 BNYVV izolatının vektör ile taşınmada etkin olan P31 genom bölgesinin nükleotit dizileri belirlenmiştir. BNYVV izolatlarının Dünya izolatları ile BLASTn analizi ve elde edilen filogenetik ağaç, Türkiye şeker pancarı üretim alanlarından elde edilen izolatların iki farklı gruba ayrıldıklarını göstermiştir. Buna göre; IGDR-6 izolatının, Fransız-P ve Çin-B streynlerinin üyelerinin bulunduğu, Grup II içerisinde; diğer izolatların (GZNP-27, ELZG-44, SMSN-61, EDRN-125, BRSA-148, CNKL-150, KSTM-281, KYSR-524 ve ANKR-617) ise İtalyan streyn grubuna dair BNYVV izolatlarının yer aldıkları Grup III'de buldukları saptanmıştır. Böylece, bu çalışma ile ilk kez Türkiye BNYVV izolatlarının P31 genom bölgesine göre moleküler açıdan karakterizasyonları yapılmıştır.

Ayrıca, bu çalışmada BNYVV'nin sistemik konukçusu olan *N. benthamiana* bitkisinde 15 BNYVV izolatının farklı gen (CP, P25, P26 ve P31) bölgeleri araştırılmıştır. Dünya izolatları ile bu çalışmadaki izolatlar kıyaslandığında, *N. benthamiana* bitkilerinde belirlenen simptom tipleri (zayıf veya şiddetli) ile P31, P25 ve P26 genlerinin bulunma durumları arasında doğrudan bir ilişkinin olmadığı

sonucuna varılmıştır. İlave olarak; bu çalışmada elde edilen bulgular; *N. benthamiana* bitkilerine virüsün ilk aktarımını takiben, bazı izolatlarda özellikle P31 genom bölgelerinde silinmenin olabileceğine işaret etmiştir. Bu sebeple; bu silinmenin net olarak ortaya konulabilmesi için, ileride P31 bölgesi için spesifik primerler ile elde edilen PCR ürünlerinin sekans analizlerinin yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Abe, H. and Tamada, T. 1986. Association of Beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 52, 235-247.
- Abe, H. and Ui, T. 1986. Host range of *Polymyxa betae* Keskin strains in rhizomania-infected soils of sugar beet fields in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 52, 394-403.
- Acosta-Leal, R., Fawley, M. W. and Rush, C. M. 2008. Changes in the intra isolate genetic structure of *Beet necrotic yellow vein virus* populations associated with plant resistance breakdown. *Virology*, 376, 60-68.
- Adams, M. 1991. Transmission of plant viruses by fungi. *Annals of Applied Biology*, 118:479-92.
- Al Musa, A. M. and Mink, G. I. 1981. *Beet necrotic yellow vein virus* in North-America. *Phytopathology*, 71, 773-776.
- Andika, I. B., Kondo, H. and Tamada, T. 2005. Evidence that RNA silencing-mediated resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* is less effective in roots than in leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 194-204.
- Anonim, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistical Database. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim Tarihi:05.10.2019)
- Anonim, 2018. TÜİK Bitkisel Üretim İstatistikleri. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 (Erişim Tarihi:05.10.2019)
- Anonim, 2019. Minden pictures. https://www.mindenpictures.com/search/preview/beet-necrotic-yellow-vein-virus-or-rhizomania-symptoms-on-sugar-beet-leaves/0_80122239.html (Erişim Tarihi: 29.12.2019)
- Asher, M. J. C. 1993. Rhizomania. In: *The Sugar Beet Crop* (Cook D.A. and Scott, R.K., eds.), pp. 311-346. London: Chapman & Hall.
- Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, J. G., Hellens, R., Bombarely, A., Goodin, M. M. and Waterhouse, P. M. 2018. The Rise and Rise of *Nicotiana benthamiana*: A Plant for All Reasons. *Annual Review of Phytopathology*, 56:405-26.
- Barr, D. J. S. 1979. Morphology and host range of *Polymyxa graminis*, *Polymyxa betae* and *Ligniera pilorum* from Ontario and some other areas. *Canadian Journal Plant Pathology*, 1:85-94.
- Barr, K. J. and Asher, M. J. C. 1996. Studies on the life-cycle of *Polymyxa betae* in sugar beet roots. *Mycological Research*, 100, 203-208.
- Biancardi, E. and Lewellen, R. T. 2016. Introduction: Pest and Diseases. Rhizomania. Eds. Biancardi, E. Tamada, T., Switzerland, Springer.

- Blaykasten, C., Gilmer, D., Guilley, H., Richards, K. E. and Jonard, G. 1996. *Beet necrotic yellow vein virus* 42 kDa triple gene block protein binds nucleic acid in vitro. *Journal of General Virology*, 77, 889-897.
- Blunt, S. J., Asher, M. J. C. and Gilligan, C. A. 1991. Infection of sugar beet by *Polymyxa betae* in relation to soil temperature. *Plant Pathology*, 40, 257-267.
- Bongiovanni, G. C. 1960. L'anguillula e la rhizomania della barbabietola. *Informatore Fitopatologico*, 2:391-397.
- Bouzoubaa, S., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K., and Putz, C. 1985. Nucleotide Sequence Analysis of RNA-3 and RNA-4 of *Beet Necrotic Yellow Vein Virus*, Isolates F2 and G1. *Journal of General Virology*, 66, 1553-1564.
- Bouzoubaa, S., Quillet, L., Guilley, H., Jonard, G. T. and Richards, K. 1987. Nucleotide sequence of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-1. *Journal of General Virology*, 68, 615-626.
- Bouzoubaa, S., Ziegler, V., Beck, D., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G. 1986. Nucleotide sequence of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-2. *Journal of General Virology*, 67, 1689-1700.
- Braselton, J. 2001. Plasmodiophoromycota. In *The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*. VII, Systematics and Evolution. Pt. A, pp. 81-91. Berlin/New York: Springer-Verlag.
- Bulman, S. R., Kuhn, S. F., Marshall, J. W. and Schnepf, E. 2001. A phylogenetic analysis of the SSU rRNA from members of the plasmodiophorida and phagomyxida. *Protist*, 152:43-51.
- Canova, A. 1959. Appunti di patologia della barbabietola. *Informatore Fitopatologico*, 9, 390-396.
- Canova, A. 1966. Ricerche Virologiche Della Bietola. *Annali Accademia Nazionale de Agricoltura*, 72, 37-46.
- Chiba, S., Kondo, H., Miyanishi, M., Andika, I. B., Han, C. G. and Tamada, T. 2011. The evolutionary history of *Beet necrotic yellow vein virus* deduced from genetic variation, geographical origin and spread, and the breaking of host resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24: 207-221.
- Chiba, S., Miyanishi, M., Andika, I. B., Kondo, H. and Tamada, T. 2008. Identification of amino acids of the *Beet necrotic yellow vein virus* p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. *Journal of General Virology*, 89, 1314-1323.
- Clark, M. and Adams, A. M. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
- D'ambra, V. and Mutto, S. 1977. The ultrastructure of *Polymyxa betae* zoospore exit tube differentiation. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 55, 831-839.
- De Biaggi, M. 1987. Methodes de selection-un cas concret. Proceedings International Institute for Beet Research (IIRB) 50th Winter Congress, Vol: II, 157-163, Brussels, Belgium.

- Dona Dalle Rose, A. 1954. Gravi sintomi di stanchezza dei bietolai. *Annali Stazione Sperimentale Bieticoltura*, Rovigo Italy, 36, 1-7.
- Dona Dalle Rose, A. 1956. Relazione sull'attività scientifica nel decennio 1947-1956. *Stazione Sperimentale Bieticoltura*, Rovigo Italy.
- Döken, T., Demirci, E. and Zengin, H. 2000. Fitopatoloji. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 314. Ziraat Fakültesi Yayınları No: 314. Ders Kitapları Serisi No: 66. 55-62.
- Duffus, J. E. 1991. Rhizomania, *Compendium of Beet Diseases and Insects*. Edited by E.D. Whitney and C.E. Duffus, 29-30. *Aps Press*. 76.
- Dunoyer, P., Pfeffer, S., Fritsch, C., Hemmer, O., Voinnet, O. and Richards, K. E. 2002. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine rich suppressor of gene silencing encoded by *Peanut clump virus*. *The Plant Journal*, 29, 555-567.
- Er, C. 2012. Şeker ve Şeker Pancarının Dünü, Bugünü ve Geleceği, 1. Uluslararası Anadolu Şeker Pancarı Sempozyumu, Kayseri, 1-12.
- Erkan, S., Gümüş, M., Paylan, İ. C. ve Sipahioğlu, H. M. 2011. Bitki virüslerinin tanımlanmasında kullanılan serolojik yöntemler. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9 (2), 35-49.
- Falk, B. W. and Duffus, J. E. 1979. The first report of *Polymyxa betae* in the Western Hemisphere. *Plant Disease Reporter*, 61, 492-494.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17:6, 368-376.
- Fujisawa, I. and Sugimoto, T., 1976. Transmission of *Beet necrotic yellow vein virus* by *Polymyxa betae*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 43, 583-586.
- Gao, J., Deng, F., Zhai, H. and Liang, X. 1983. The occurrence of sugar beet rhizomania caused by *Beet necrotic yellow vein virus* in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 13:1-4.
- Gilmer, D. 2017. Virus Taxonomy Profile: Benyviridae. *Journal of General Virology, Microbiology Society*, 98 (7), pp.1571-1572.
- Gilmer, D. and Ratti, C. 2017. ICTV Report Consortium. ICTV virüs taxonomy profile: Benyviridae. *Journal of General Virology*, <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000864>
- Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G. 1992. Efficient cell-to-cell movement of *Beet necrotic yellow vein virus* requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology*, 189, 40-47.
- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A. and Lommel, S. A. 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 21, 1015-1026.
- Grimmer, M. K., Trybush, S., Hanley, S., Francis, S. A., Karp, A. and Asher, M. J. C. 2007. An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD

- markers and QTL mapping of a new source of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 1151-1160.
- Haeberlé, A. M. and Stussi-Garaud, C. 1995. In situ localization of the non-structural protein P25 encoded by *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-3. *Journal of General Virology*, 76, 643-650.
- Hamacher, J., Wetter, M. and Schulz, M. 2003. Ubiquitination of TMV coat protein aggregates in infected tobacco leaves. *Journal of Phytopathology*, 151:652–659.
- Hamdorf, G., Lesamann, D. E. and Weidemann, H. L. 1977. Untersuchungen über die Rhizomania-Krankheit an Zuckerrüben in der Bundesrepublik Deutschland. *Journal of Phytopathology*, 90:97-103.
- Harju, V. A., Mumford, R. A., Blockley, A., Boonham, N., Clovert, G. R. G., Weekes, R. and Henry, C. M. 2002. Occurrence in the United Kingdom of *Beet necrotic yellow vein virus* isolates which contain RNA-5. *Plant Pathology*, 51, 811.
- Harju, V. A., Skelton, A., Clover, G. R. G., Ratti, C., Boonham, N., Henry, C. M. and Mumford, R. A. 2005. The Use of real-Time RT-PCR (TaqMan) and Post-ELISA virus release for the detection of *Beet necrotic yellow vein virus* types containing RNA 5 and its comparison with conventional RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 123, 73-80.
- Hebrard, E., Froissart, R., Louis, C. and Blanc, S. 1999. Les modes de transmission des virus phytopathogènes par vecteurs. *Virologie*, 3(1):35-48.
- Horváth, J. 1994. *Beet necrotic yellow vein furovirus* 1. New host. *Acta Phytopathol Hung*, 29:109-118.
- Hugo, S. A., Henry, C. M. and Harju, V. 1996. The role of alternative hosts of *Polymyxa betae* in transmission of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in England. *Plant Pathology*, 45, 662-666.
- Ivanović, M. 1983. Viruses of Sugar Beet Associated with *Polymyxa betae*. *Ann. Rep. Rothamsted Exp. St.* 1982, pp. 189-190.
- Jupin, I., Guilley, H., Richards, K. E. and Jonard, G. 1992. Two proteins encoded by *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-3 influence symptom phenotype on leaves. *The EMBO Journal*, 11, 479-488.
- Jupin, I., Tamada, T. and Richards, K. 1991. Pathogenesis of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Seminars in Virology*, 2, 121-129.
- Kaya, R. 2009. Distribution of rhizomania disease in sugar beet growing areas of Turkey, *Tarım Bilimleri Dergisi*, 15 (4), 332-340.
- Kelly, L. J., Leitch, A. R., Clarkson, J. J., Knapp, S. and Chase, M. W. 2013. Reconstructing the complex evolutionary origin of wild allopolyploid tobaccos (*Nicotiana* section *suaveolentes*). *Evolution*, 67:80–94.
- Keskin, B. 1964. *Polymyxa betae* n.sp. ein parasit in den wurzein von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während den jugendent wicklung den zuckerrübe. *Archives of Microbiology*, 49:348-374.

- Kiguchi, T., Saito, M. and Tamada, T. 1996. Nucleotide sequence analysis of RNA-5 of five isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* and identity of a deletion mutant, *Journal of General Virology*, 77, 575-580.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F. and David, J. C. 2001. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 9th Edition, CABI Bioscience, UK, 624.
- Koch, F. 1987. Bericht über eine in verschiedene zuckerrübenanbaugebiete der Turkseker in Anatolien und Thrazien zum stadium von wurzelerkrankungen. KWS Kleinwanzlebener Saatzucht, AG, Einbeck, Germany.
- Koenig, R., 2008. Benyvirus A2 – Mahy, Brian W. J., in: Regenmortel, M. H. V. V. (Ed.), *Encyclopedia of Virology* (Third Edition). Academic Press, Oxford, pp. 308-314.
- Koenig, R. and Lennefors, B. L. 2000. Molecular analyses of European A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Archives of Virology*, 145, 1561-1570.
- Koenig, R., Haeblerlé, A. M. and Commandeur, U., 1997. Detection and characterization of a distinct type of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5 in a sugar beet growing area in Europe. *Archives of Virology*, 142, 1499-1504.
- Koenig, R., Jarausch, W., Li, Y., Commandeur, U., Burgermeister, W., Gehrke, M. and Luddecke, P. 1991. Effect of recombinant *Beet necrotic yellow vein virus* with different RNA compositions on mechanically inoculated sugar beets. *Journal of General Virology*, 72, 2243-2246.
- Koenig, R., Kastirr, U., Holtschulte, B., Deml, G. and Varrelmann, M., 2008. Distribution of various types and P25 subtypes of *Beet necrotic yellow vein virus* in Germany and other European countries. *Archives of Virology*, 153, 2139-2144.
- Koenig, R., Lüddecke, P. and Haeblerle, A. M. 1995. Detection of *Beet necrotic yellow vein virus* strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *Journal of General Virology*, 76, 2051-2055.
- Koenig, R., Burgermeister, W., Weich, H., Sebald, W. and Kothe, C. 1986. Uniform RNA patterns of *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet roots, but not in leaves from several plants species. *Journal of General Virology*, 67: 2043-2046.
- Kouyeas, H. 1979. The rhizomania of sugar beet. *Annual Institute Phytopathology*, 12: 151-153.
- Kruse, M., Koenig, R., Hoffman, A., Kaufmann, A., Commandeur, U., Solevyevev, A. G., Savenkov, I. and Burgermeister, W. 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Journal of General Virology*, 75, 1835-1842.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.

- Kuszala, M. and Putz, C. 1977. Rhizomania of sugar beet in Alsace. Host range and biological properties of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Annals of the Phytopathological*, 9:435-446.
- Kutluk Yılmaz, N. D., Meunier, A., Schmit, J. F., Stas, A. and Bragard, C. 2007. Partial nucleotide sequence analysis of Turkish isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) RNA-3. *Plant Pathology*, 56, 311-316.
- Kutluk Yılmaz, N. D., Sökmen, M., Kaya, R., Sevik, M. A., Tunalı, B. and Demirtas, S. 2016a. The widespread occurrences of *Beet soilborne virus* and RNA-5 containing *Beet necrotic yellow vein virus* isolates in sugar beet production areas in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 144, 443-455.
- Kutluk Yılmaz, N. D., Kaya Altop, E., Phillippo, C. J. and Mennan, H. 2016b. New natural weed host *Raphanus raphanistrum* L. (Brassicaceae) for *Beet necrotic yellow vein virus* and its vector *Polymyxa betae* Keskin. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40, 120-126.
- Kutluk Yılmaz, N. D., Sokmen, M., Gulser, C., Saracoglu, S. and Yılmaz, D. 2010. Relationships between soil properties and soil-borne viruses transmitted by *Polymyxa betae* Keskin in sugar beet fields. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8:766-769.
- Lauber, E., Bleykasten-Grosshans, C., Erhardt, M., Bouzoubaa, S., Jonard, G., Richards, K. E. and Guilley, H. 1998a. Cell-to-cell movement of Beet necrotic yellow vein virus: I. Heterologous complementation experiments provide evidence for specific interactions among the triple gene block proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 618-625.
- Lauber, E., Guilley, H., Tamada, T., Richards, K. E. and Jonard, G. 1998b. Vascular movement of *Beet necrotic yellow vein virus* in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA-3 sequence domain rather than a gene product. *Journal of General Virology*, 79, 385-393.
- Lemaire, O., Beuve, M., Weber, C., Schirmer, A. Link, D., Meunier, A., Bragard, C. and Gilmer, D. 2003. Etiology and molecular epidemiology of a severe rhizomania disease occurring in confined locations in Europe: hypothesis for the implication of the RNA-3 and/or -5 of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV)-P pathotype. Proceedings of the 1st joint IIRB-ASSBT Congress, 27 February-1 March, 303-18, San Antonio, USA.
- Lennefors, B. L. 2006. Molecular Breeding for Resistance to Rhizomania in Sugar Beets. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, 41, Uppsala.
- Lewellen, R. T. 1995. Registration of sugarbeet germplasm lines with multiple disease resistance: C39, C39R, C39R-6, C-47, C-93, and C-94. *Crop Science*, 35: 2 (13): 597-598.
- Lewellen, R. T., Skoyen, I. O. and Erichsen, A. W. 1987. Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: Evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance of resistance. Proceedings 50th IIRB winter congress, Vol. II: 139-156, Brussels, Belgium.

- Li, M., Liu, T., Wang, B., Han, C. G., Li, D. W. and Yu, J. L. 2008. Phylogenetic analysis of *Beet necrotic yellow vein virus* isolates from China. *Virus Genes*, 36, 429-432.
- Link, D., Schmidlin, L., Schirmer, A., Klein, E., Erhardt, M., Geldreich, A., Lemaire, O. and Gilmer, D. 2005. Functional characterization of the *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5 encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *Journal of General Virology*, 86, 2115-2125.
- Littlefield, L. and Whallon, J. 1999. Comparative anatomy, taxonomy and biology of *Polymyxa betae* and *Polymyxa graminis*: an overview. See Ref. 101, pp. 93-96.
- Liu, H. Y. and Lewellen, R. T. 2007. Distribution and molecular characterization of resistance breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* in the United States. *Plant Disease*, 91:847-851.
- Liu, H., Han, C., Li, D., Cai, Z., Yu, J. and Liu, Y. 2003. Effect of the RNA5 component on pathogenicity of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Chinese Science Bulletin*, 48, 796-799.
- McGrann, G. R., Grimmer, M. K., Mutasa-Gottgens, E. S. and Stevens, M. 2009. Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. *Molecular Plant Pathology*, 10, 129-141.
- Mehrvar, M., Valizadeh, J., Koenig, R. and Bragard, C. 2009. Iranian *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV): pronounced diversity of the p25 coding region in A-type BNYVV and identification of P-type BNYVV lacking a fifth RNA species. *Archives of Virology*, 154, 501-506.
- Meunier, A., Schmit, J. F., Stas, A., Kutluk, N. and Bragard, C. 2003. Multiplex reverse transcription for simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soil-borne virus*, and *Beet virus Q* and their vector *Polymyxa betae* Keskin on sugar beet. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2356-2360.
- Miyaniishi, M., Kusume, T., Saito, M. and Tamada, T. 1999. Evidence for three groups of sequence variants of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5. *Archives of Virology*, 144, 879-892.
- Monteiro, F., Romeiras, M. M., Batista, D. and Duarte, M. C. 2013. Biodiversity assessment of sugar beet species and its wild relatives: linking ecological data with new genetic approaches. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 21-34.
- Mouhanna, A.M., Nasrallah, A., Langen, G. and Schlösser, E., 2002. Surveys for *Beet Necrotic Yellow Vein Virus* (the Cause of Rhizomania) Other Viruses, and Soil Borne Fungi Infecting Sugar Beet in Syria. *Journal of Phytopathology*, 150, 657-662.
- Mutasa, E. S., Chwarszczynska, D. M. and Asher, M. J. C. 1996. Single-tube, nested PCR for the diagnosis of *Polymyxa betae* infection in sugar-beet roots and colorimetric analysis of amplified products. *Phytopathology*, 86:493-497.
- Neuhauser, S., Bulman, S. and Kirchmair, M. 2010. Plasmodiophorids: the challenge to understand soilborne, obligate biotrophs with a multiphasic life cycle. In: Gherbawy Y, Voigt K (eds) *Molecular identification of Fungi*. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 51-78.

- Neuhauser, S., Kirchmair, M. and Gleason, F. H. 2011. Ecological roles of the parasitic phytomyxids (plasmodiophorids) in marine ecosystems-a review. *Marine and Freshwater Research*, 62:365-371.
- Özgür, O. E. 2003. Türkiye Şeker Pancarı Hastalıkları. Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Genel Müdürlüğü. Yayın No: 219, Ankara, Pp: 192.
- Paul, H., Henken, B. and Alderlieste, M. F. J. 1992. A greenhouse test for screening sugar-beet (*Beta vulgaris*) for resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV). *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 98: 65-75.
- Payne, P. A. and Asher, M. J. C. 1990. The incidence of *Polymyxa betae* and other fungal root Parasites sugar beet in Britain. *Plant Pathology*, 39, 443-451.
- Peltier, C., Hleibieh, K., Thiel, H., Klein, E., Bragard, C. and Gilmer, D. 2008. Molecular biology of the *Beet necrotic yellow vein virus*. *Plant Viruses*, 2, 14-24.
- Pferdmenges, F. 2007. Occurrence, spread and pathogenicity of different *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) isolates. Der Georg-August-Universität, Doctoral Thesis, 110 pp, Göttingen.
- Piolanti, G., Lanzoni, L. and Bongiovanni, G. C. 1957. Osservazioni sul fenomeno dei bassi titoli in alcune province venete. *Giornale del Bieticoltore*, 2:12.
- Poimenopoulou, E. 2017. Molecular characterization of *soil-borne viruses* infecting sugar beet in Europe and USA. Second cycle, A2E. Uppsala: SLU, Department of Plant Biology.
- Putz, C. 1977. Composition and structure of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Journal of General Virology*, 35:397-401.
- Putz, C. and Vuittenez, A. 1974. Observation des particules virales chez des betteraves presentant, en Alsace, des symptomes de 'Rhizomanie'. *Annual Phytopathology*, 6:129-138.
- Rahim, M. D., Andika, I. B., Han, C., Kondo, H. and Tamada, T. 2007. RNA-4 encoded p31 of *Beet necrotic yellow vein virus* is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *Journal of General Virology*, 88:1611-1619.
- Rezaei, J., Bannayan, M., Nezami, A., Mehrvar, M. and Mahmoodi, B. 2014. Growth analysis of rhizomania infected and healthy sugar beet. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 17:59-69.
- Rezende, J. A. M., Camelo, V. M., Flôres, D., Mello, A. P. O., Kitajima, E. W. and Bedendo, I. P. 2015. First report of *beet necrotic yellow vein virus* on red table beet in Brazil. *Plant Disease*, 99, 423.
- Roberts, R., Botha, W. J., Wolfaardt, J. P. and Jooste, A. E. C. 2015. First report of *beet necrotic yellow vein virus* on red table beet in South Africa. *Plant Disease* "First Look" paper. [http:// dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0919-PDN](http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0919-PDN)
- Rush, C. M. 2003. Ecology and epidemiology of Benyviruses and Plasmodiophorid Vectors. *Annual Review of Phytopathology*, 41:567-592.

- Rush, C. M. and Heidel, G. B. 1995. Furovirus Diseases of Sugar Beets in the United States. *Plant Disease*, 79 (9), 868-875.
- Rush, C. M., Liu, H. Y. and Lewellen, R. T. 2006. The continuing saga of rhizomania of sugar beets in the United States. *Plant Disease*, 90 (1), 4-15.
- Rysanek, P., Homa, I., Zouhar, M., Rozo, M. and Putz, C. 2008. Host range and host (un)specificity of different *Polymyxa betae* isolates. Proc. 7th Symp. Int. Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Quedlinburg-Germany: 54-58.
- Satoh, K., Kondoh, H., Sasaya, T., Shimizu, T. and Choi, I. R. 2010. Selective modification of rice (*Oryza sativa*) gene expression by *Rice stripe virus* infection. *Journal of General Virology*, 91:294-305.
- Schirmer, A., Link, D., Cognat, V., Beuve, M., Meunier, A., Bragard, C., Gilmer, D. and Lemaire, O. 2005. Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *Journal of General Virology*, 86, 2897-2911.
- Scholten, O. E., De Bock, T. S. M., Klein-Lankhorst, R. M. and Lange, W. 1999. Inheritance of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* in *Beta vulgaris* conferred by a second gene for resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 99:740-746.
- Scholten, O. E., Jansen, R. C., Keizer, L. C. P., De Bock T. S. M. and Lange, W. 1996. Major genes for resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in *Beta vulgaris*. *Euphytica*, 91:331-339.
- Scholten, O. E., Lange, W., 2000. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: a review. *Euphytica*, 112:219-231.
- Scholten, O. E., Paul, H., Peter, D., Van Lent, J. W. and Goldbach, R. W. 1994. In situ localisation of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in rootlets of susceptible and resistant beet plants. *Archives of Virology*, 136:349-361.
- Smith, K. M. 1972. A Textbook of Plant Virus Diseases. Academic Press, Inc. III. Fifth Avenue, New York, 684p
- Tamada, T. 1975. *Beet necrotic yellow vein virus*. CMI/ ABB. *Description of Plant Viruses*,
- Tamada, T. 2002. Beet necrotic yellow vein virus. CMA/ABB descriptions of plant viruses. *Association of Applied Biologists*. Wellesbourne UK. <http://www.dpvweb.net//dpv//showdpv.php?dpvno=391>
- Tamada, T. 2007. Susceptibility and resistance of *Beta vulgaris* subsp. *maritima* to foliar rub-inoculation with *Beet necrotic yellow vein virus*. *Journal of General Plant Pathology*, 73:76-80.
- Tamada, T. and Abe, H. 1989. Evidence that *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-4 is essential for efficient transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *Journal of General Virology*, 70:3391-3398.
- Tamada, T. and Baba, T. 1973. *Beet necrotic yellow vein virus* from "Rhizomania" Affected Sugar Beet in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 39:325-352.

- Tamada, T., Baba, T. and Abe, H. 1971. A virüs isolated from sugar beet showing Rizomania like symptoms and its transmission in soil. *Proceedings of the Sugar Beet Research Association Japan*, 13:179-186.
- Tamada, T., Kondo, H. and Chiba, S. 2016. Genetic diversity of *Beet necrotic yellow vein virus*. Rhizomania. Eds. Biancardi, E. Tamada, T., Switzerland, Springer.
- Tamada, T., Kusume, T., Uchino, H., Kiguchi, T. and Saito, M. 1996. Evidence that *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5 is involved in symptom development of sugar beet roots. Proc. 3rd Symp. Int. Work. Group Plant Viruses Fungal Vektors, pp:49-52.
- Tamada, T., Saito, M., Kiguchi, T. and Kusume, T. 1990. Effect of Isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* with Different of RNA Components on the Development of Rhizomania Symtoms. Ist. Proc. Symp. Int. Work. Group. Plant Viruses Fungal Vectors, Braunschweig-Germany, pp:41-44.
- Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., Kiguchi, T. and Harada, T. 1989. Production and pathogenicity of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* with different numbers of RNA components. *Journal of General Virology*, 70, 3399-3409.
- Tamada, T., Uchino, H., Kusume, T. and Saito, M. 1999. RNA 3 deletion mutants of *beet necrotic yellow vein virus* do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology*, 89:1000-1006.
- Tamura, K. and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
- Thompson, J. D, Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-80.
- Von Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. and Wickner, R. B. 2000. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses, 7th Report of the International on Taxonomy of Viruses, Academic Press, pp: 904-922.
- Wang, Y., Fan, H., Wang, X. B., Li, M., Han, C. and Yu, J. 2011. Detection and characterization of spontaneous internal deletion mutants of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-3 from systemic host *Nicotiana benthamiana*. *Virology Journal*, 8: 335.
- Ward, E. and Adams M. J. C. 1998. Analysis of ribosomal DNA sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus- and species specific PCR primers. *Mycology Research*, 102: 965-974.
- Ward, E., Adams, M. J., Mutasa, E. S., Collier, C. R. and Asher, M. J. C. 1994. Characterisation of *Polymyxa* species by restriction analysis of PCR-amplified ribosomal DNA. *Plant Pathology*, 3:872-877.
- Ward, E., Kanyuka, K., Motteram, J., Korniyukhin, D. and Adams, M. J. 2005. The use of conventional and quantitative real-time PCR assays for *Polymyxa graminis* to

- examine host plant resistance, inoculum levels and intraspecific variation. *New Phytologist*, 165:875–878.
- Ward, E., Koenig, R., Budge, G., Garrido, C., McGrath, C., Stubbley, H. and Boonham, N. 2007. Occurrence of two different types of RNA-5 containing Beet necrotic yellow vein virus in the UK. *Archives of Virology*, 152, 59-73.
- Whitney, E. D. and Duffus, J. E. 1991. Rhizomania (*Beet Necrotic Yellow Vein Virus*). Compendium of Beet Diseases and Insects. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, p.76.
- Winner, C. 1984. Viröse Wurzelbartigkeit (Rhizomania) der Beta-Rübe als Herausforderung Für Forschung und Resistenzzüchtung. *Zuckerindustrie*, 109, 113-120.
- Yardımcı, N., Çulal Kılıç, H. ve Ürgen, G. 2012. Eskişehir ili şeker pancarı üretim alanlarında görülen bazı virüs hastalıklarının DAS-ELISA yöntemiyle belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 7 (1), 42-50.
- Zhou, N., Jiang, N., Zhang, C., Zhang, Z. Y., Zhang, G. Z., Han, C. G. and Wang, Y. 2015. Genetic diversity and population structure of *Beet necrotic yellow vein virus* in China. *Virus Research*, 205, 54-62.

EKLER

EK 1. Hoagland Solüsyonu

Tuzak bitki testi sırasında bitkilerin sulanması amacıyla kullanılan Hoagland besin solüsyonu A, B ve C olmak üzere üç stok solüsyondan oluşmaktadır (Dijkstra ve De Jager, 1998).

-A Solüsyonu: 5.06 g KNO₃, 1.36 g KH₂PO₄, 4.93 g MgSO₄.7 H₂O, 12.40 g Ca(NO₃).4H₂O, 5.85 g NaCl maddeleri 1000 ml saf su ilave edilerek çözülmüştür.

-B Solüsyonu: 1 g FeSO₄.7H₂O, 1.04 g EDTA maddeleri ayrı ayrı 50 şer ml'lik saf suda çözdürüldükten sonra bir arada karıştırılmıştır.

-C Solüsyonu: 0.110 g H₃BO₄, 0.015 g CuCl₂.2H₂O, 0.010 g ZnCl₂, 0.015 g MnCl₂.2H₂O, 0.03 g MoO₃ maddeleri 100 ml saf suda çözülmüştür.

Hoagland solüsyonunu; A solüsyonundan 600 ml, B ve C solüsyonlarından 15'er ml alınarak, bu üç solüsyon bir araya getirilip, saf su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

EK 2. ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler (gr/l)

-Fosfat Tamponu Salin (PBS) (pH= 7.4): 8.0 g NaCl, 0.2 g KH₂ PO₄, 0.2 g KCl, 0.2 g NaN₃, 2.9 g Na₂HPO₄. Kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı 0.1 M NaOH veya 0.1 M HCl ile ayarlanmış ve 4°C' de saklanmıştır.

-Kaplama Tampon Çözeltisi (pH= 9.6): 1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 0.2 g NaN₃. Kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH' sı ayarlanmış ve 4°C'de saklanmıştır. Ancak her kullanımda pH tekrar kontrol edilmiştir.

-Yıkama Tampon Çözeltisi: 1 lt PBS'ye 0.5 ml Tween-20 eklenip karıştırılmıştır.

-Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi: 1 lt yıkama tampon çözeltisi + 20 g (%2) Polyvinylpyrrolidone 40.000 (PVP-40) + 1g yağsız süt tozu ilave edilerek hazırlanmıştır.

-Konjugat Tampon Çözeltisi: Konjugat tampon çözeltisi, ekstraksiyon tampon çözeltisi olarak da kullanılmıştır.

-Substrat Tampon Çözeltisi (pH= 9.8): 9.7 ml Diethanolamin 80 ml saf su içine ilave edildikten sonra 20 mg NaN₃ konmuş ve HCl ile pH 9.8' e ayarlanarak 100 ml'ye tamamlanmıştır.

EK-3. Türkiye izolatlarının RNA-4 segmenti P31 bölgesini içeren kısmi baz dizilerinin Dünya'daki bazı BNYVV izolatları ile nükleotit düzeyinde karşılaştırılması

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Start Kodon	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	İğdir	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCCTCCTTTGATACGTCATGAA	60
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
AM779754	İran	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCCTCCTTTGATACGTCATGAA	60
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCCTCCTTTGATACGTCATGAA	60
AB563113	Çin	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCCTCCTTTGATACGTCATGAA	60
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCCTCCTTTGATACGTCATGAA	60
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCCTCCTTTGATACGTCATGAA	60
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCCTCCTTTGATACGTCATGAA	60
AB563142	USA	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCTTCCTTTGATACGTCATGAA	60
DQ440515	UK	Şeker pancarı	1	ATG	GCTGATGGAGAGATATGTCGGTGTGTCAGGTTACTGATCCTCCTTTGATACGTCATGAA	60

EK 3. (Devam)

İzolot Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	İğdir	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
AM779754	İran	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
AB563113	Çin	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
AB563142	USA	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120
DQ440515	UK	Şeker pancarı	61	GACTATGATTGCTACTGCTAGGATGGTGCAGAAACGGATTGAGATTGGCCCATTGGGTGT	120

EK 3. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATAATGATGTTTATCCG	180
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	121	TTACTTAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
AM779754	İran	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATAATGATGTTTATCCG	180
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATAATGATGTTTATCCG	180
AB563113	Çin	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATAATGATGTTTATCCG	180
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATAATGATGTTTATCCG	180
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATAATGATGTTTATCCG	180
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATAATGATGTTTATCCG	180
AB563142	USA	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATACTGATGTTTATCCG	180
DQ440515	UK	Şeker pancarı	121	TTACTCAATCTTAAATATGTTATTTTCATATGTCTCGTGTAGACATAATGATGTTTATCCG	180

EK 3. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGCTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
AM779754	İran	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGCTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGCTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
AB563113	Çin	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGCTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGCTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGCTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
AB563142	USA	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240
DQ440515	UK	Şeker pancarı	181	TATCTGAATAATATTATGTCTATTTCCGGTGTGCGTTGGATGTTCCCTGTGTCTAGTGGCGTT	240

EK 3. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	241	GGTGGTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
AM779754	İran	Şeker pancarı	241	GGTGGTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	241	GGTGGTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
AB563113	Çin	Şeker pancarı	241	GGTGGTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	241	GGTGGTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	241	GGTGGTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	241	GGTGGTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
AB563142	USA	Şeker pancarı	241	GGCGTTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300
DQ440515	UK	Şeker pancarı	241	GGTGGTGGACGTGTACGTGTTTAAATATTTACAAGTAGTCGTGAACGTGTTGGTATATTC	300

EK 3. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	301	CACGGATGGCAGATTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
AM779754	İran	Şeker pancarı	301	CACGGATGGCAGATTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	301	CACGGATGGCAGATTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
AB563113	Çin	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCTCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	301	CACGGATGGCAGATTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	301	CACGGATGGCAGATTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	301	CACGGATGGCAGATTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
AB563142	USA	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360
DQ440515	UK	Şeker pancarı	301	CATGGATGGCAGGTTGTGCCTTGGGTGCTTTCTTAAATGCCCCCGTGTTATAGTGGTGTTGAT	360

EK 3. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	İğdir	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGTTGTGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
AM779754	İran	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGTTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGTTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
AB563113	Çin	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGTTATGTGAAGCTAAATTATTACTAATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGTTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGTTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGTTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
AB563142	USA	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGCTATGTGAAGCTAAATTATTGTTTCATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420
DQ440515	UK	Şeker pancarı	361	GTTCTGTCTGATGAGTTATGTGAAGCTAAATTATTACTAATACTTCGGTTTCGTCTGTTGCG	420

EK 3. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	421	ATGTTCCGATAGGTCGTA ^{TAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^A CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
AM779754	İran	Şeker pancarı	421	ATGTTCCGATAGGTCGTA ^{TAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^A CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	421	ATGTTCCGATAGGTCGTA ^{TAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^A CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
AB563113	Çin	Şeker pancarı	421	ATGTTCAATGGGTCGTA ^{TAG} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^A CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	421	ATGTTCCGATAGGTCGTA ^{TAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^A CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	421	ATGTTCCGATAGGTCGTA ^{TAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^A CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	421	ATGTTCCGATAGGTCGTA ^{TAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^A CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
AB563142	USA	Şeker pancarı	421	ATGTTCAATAGGTCGTA ^{CAA} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^G CTATTACTTACGTCTAGTACT	480
DQ440515	UK	Şeker pancarı	421	AT ^T TTC ^A ATGGGTCGTA ^{TAG} ACCTGAAGACGTCTGGAT ^A CTATTACTTACGTCTAGTACT	480

EK 3. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGA ^G ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
AM779754	İran	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGA ^G ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
AB563113	Çin	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGA ^T ATAGAACAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGA ^G ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGA ^G ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
AB563142	USA	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGAA ^A ATAGACCAATGTACATTACCTTCTAATATA	540
DQ440515	UK	Şeker pancarı	481	TGTTATGGTTATCATGATGTTGTTGTTGA ^T ATAGAACAATGTACATTACCTTCTAATATA	540

EK 3. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
AM779754	İran	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
AB563113	Çin	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTTGGTTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
AB563142	USA	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTCAATTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600
DQ440515	UK	Şeker pancarı	541	GATGGGTGTGTTTGGTTGTTCTGGCGTTTGCTATTTCAATGATAATCATTGTTTTTGTGGT	600

EK 3. (Devam)

İzolot Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	İğdir	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
AM779754	İran	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
AB563113	Çin	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
AB563142	USA	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660
DQ440515	UK	Şeker pancarı	601	CGTCGTGATAGTAATCCATTCAATCCGCCTTGTTTTCAATTTATTAAGATTGTAATGAG	660

EK 3. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTTGTGGTGTATGATAAATTG	720
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
AM779754	İran	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTTGTGGTGTATGACAATTG	720
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTTGTGGTGTATGACAATTG	720
AB563113	Çin	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTTGTGGTGTATGATAAATTG	720
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTTGTGGTGTATGACAATTG	720
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTTGTGGTGTATGACAATTG	720
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTTGTGGTGTATGACAATTG	720
AB563142	USA	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTCGTTGGTGTATGATAAATTG	720
DQ440515	UK	Şeker pancarı	661	TTGTATGGAACAAAATGAAACTAAACAATTCATTTGTGACCTTGTGGTGTATGATAAATTG	720

EK 3. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
AM779754	İran	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
AB563113	Çin	Şeker pancarı	721	GATAGTGTTAACTCTAACAAAAGGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
AB563142	USA	Şeker pancarı	721	GACAGTGTTAACTCTAACAAAAGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780
DQ440515	UK	Şeker pancarı	721	GATAGTGTTAACTCTAACAAAAGGAAGGGTGGCGAAGGTTTTGTGATGTTCTTTGGAAT	780

EK 3. (Devam)

İzolot Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi	Baz No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
AM779754	İran	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	781	ACCACTTA CGGC GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC CCGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
AB563113	Çin	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGGTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
AB563142	USA	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGCTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840
DQ440515	UK	Şeker pancarı	781	ACCACTTA TGGT GATGTTGAGTCTCGTACTTTTGC ACGGTTTCTGTGGTTTGTCTTTTAT	840

EK 3. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	Baz No	Nükleotit Dizisi STOP KODON	Baz No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	841	CACGAT TAG	849
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	841	CACGAT TAG	849
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	841	CACGAT TAG	849
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	841	CACGAT TAG	849
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	841	CACGAT TAG	849
AM779754	İran	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
AB563113	Çin	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
AB563142	USA	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849
DQ440515	UK	Şeker pancarı	841	CACGAT TAG	849

EK 4. Türkiye BNYVV izolatları P31 proteininin Dünya'daki bazı BNYVV izolatları ile amino asit düzeyinde karşılaştırılması

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	AA. No	Amino asit dizisi	AA. No
IGDR-6	İğdir	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD P PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
AM779754	İran	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD P PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD P PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
AB563113	Çin	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD P PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD P PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD P PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD P PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
AB563142	USA	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD L PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50
DQ440515	UK	Şeker pancarı	1	MADGEICRCQVTD P PLIRHEDYDCTARMVQKRIEIGPLGVLLNLNMLFHM	50

EK 4. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	AA. No	Amino asit dizisi	AA. No
IGDR-6	İğdir	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
AM779754	İran	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
AB563113	Çin	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
AB563142	USA	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100
DQ440515	UK	Şeker pancarı	51	SRVRHIDVYPYLNINMISISVSLDVPVSSGVGVGRVRLIFTTSRERVGIF	100

EK 4. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	AA. No	Amino asit dizisi	AA. No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	101	HGWQI VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFDRSYKPED	150
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV VMFNRSYKPED	150
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
AM779754	İran	Şeker pancarı	101	HGWQI VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFDRSYKPED	150
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	101	HGWQI VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV VMFDRSYKPED	150
AB563113	Çin	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI TNSVSSV AMFNGSYRPED	150
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	101	HGWQI VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFDRSYKPED	150
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	101	HGWQI VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFDRSYKPED	150
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	101	HGWQI VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFDRSYKPED	150
AB563142	USA	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI VHTSVSSV AMFNRSYKPED	150
DQ440515	UK	Şeker pancarı	101	HGWQV VPGCFLNAPCYSGVDVLSDELCEANI TNSVSSV AIFNGSYRPED	150

EK 4. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	AA. No	Amino asit dizisi	AA. No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	151	VW I LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC F CG	200
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC F CG	200
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
AM779754	İran	Şeker pancarı	151	VW I LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC F CG	200
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	151	VW I LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC F CG	200
AB563113	Çin	Şeker pancarı	151	VW I LLLTSSTCYGYHDVVV D EIQCTLPSNIDGCV C CSGVCYFNDNHC F CG	200
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	151	VW I LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC F CG	200
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	151	VW I LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC F CG	200
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	151	VW I LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC F CG	200
AB563142	USA	Şeker pancarı	151	VW M LLLTSSTCYGYHDVVV E IQCTLPSNIDGCV H CSGVCYFNDNHC I CG	200
DQ440515	UK	Şeker pancarı	151	VW I LLLTSSTCYGYHDVVV D EIQCTLPSNIDGCV C CSGVCYFNDNHC F CG	200

EK 4. (Devam)

İzolat Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	AA. No	Amino asit dizisi	AA. No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	201	RRDSNPFNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
AM779754	İran	Şeker pancarı	201	RRDSNPFNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	201	RRDSNPFNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
AB563113	Çin	Şeker pancarı	201	RRDSNPFNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	201	RRDSNPFNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	201	RRDSNPFNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	201	RRDSNPFNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
AB563142	USA	Şeker pancarı	201	RRDSNPSNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250
DQ440515	UK	Şeker pancarı	201	RRDSNPFNPPCFQFIKDCNELYGTNETKQFICDLVGD	250

EK 4. (Devam)

İzolot Adı/ GenBank Erişim No	Orjin	İzole Edildiği Bitki	AA. No	Amino asit dizisi	AA. No
IGDR-6	Iğdır	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
GZNP-27	Gaziantep	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
ELZG-44	Elazığ	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
ELZG-44-1	Elazığ	<i>N. benthamiana</i>	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
SMSN-61	Samsun	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
EDRN-125	Edirne	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
BRSA-148	Bursa	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
BRSA-148-2	Bursa	<i>N. benthamiana</i>	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
CNKL-150	Çanakkale	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
CNKL-150-3	Çanakkale	<i>N. benthamiana</i>	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
KASTM-281	Kastamonu	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
KYSR-524	Kayseri	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
KYSR-524-1	Kayseri	<i>N. benthamiana</i>	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
ANKR-617	Ankara	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
ANKR-617-3	Ankara	<i>N. benthamiana</i>	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
AM779754	İran	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
EU864119	Almanya	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
AB563113	Çin	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
AB563093	Japonya	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
AB563124	İtalya	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
AB563127	Fransa	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
AF197554	Kazakistan	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
AB563142	USA	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282
DQ440515	UK	Şeker pancarı	251	WRRFCDVLWNTTYGDVESRTFARFLWFVfyhd	282

ÖZ GEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Murat GÜNGÖR
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 29.03.1987
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Feza Anadolu Lisesi (2005)
Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü (2010-2013)
Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı (2013-2020)

YAYINLAR:

Güngör, M., Uzunbacak, H., Kutluk Yılmaz, N. D., Şevik, M. A., 2016. Samsun ilinde ıspanakta enfeksiyon oluşturan virüslerin belirlenmesi. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri. 5-8 Eylül 2016, Konya. s.699. (Özet)

Güngör, M., Uzunbacak, H., Kutluk Yılmaz, N. D., Şevik, M. A., 2017. Samsun ili ıspanak üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan virüslerin belirlenmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi/ Anadolu J. Agr. Sci., 32: 164-168. (Uluslararası Hakemli)